

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О. В. ПАЛЛАДИНА

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

Успенська Катерина Романівна

УДК [577.29]:[612.014.46]

ДИСЕРТАЦІЯ

**МЕХАНІЗМИ СИГНАЛЮВАННЯ ТА БІОЛОГІЧНА РОЛЬ
НІКОТИНОВИХ АЦЕТИЛХОЛІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ У МІТОХОНДРІЯХ**

03.00.04 – біохімія

Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Успенська К.Р.

Науковий керівник: **Скок Марина Володимирівна**, академік НАН України, доктор біологічних наук, професор.

Київ – 2018

АНОТАЦІЯ

Успенська К.Р. Механізми сигналювання та біологічна роль нікотинових ацетилхолінових рецепторів у мітохондріях. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.04 «Біохімія». – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2018.

Нікотинові ацетилхолінові рецептори (nAChR) – це ліганд-залежні іонні канали, що складаються з п'яти однакових або різних субодиниць (гомо- та гетеропентамери відповідно). nAChR, що локалізовані на зовнішній мембрані збудливих клітин, беруть участь у передачі сигналів у нервово-м'язових або нервових синапсах. nAChR нейронального типу також експересуються у багатьох незбудливих клітинах (гепатоцитах, епітеліальних клітинах, кератиноцитах, клітинах імунної системи, астроцитах). nAChR незбудливих клітин залучені до регуляції таких важливих функцій клітин як рухливість, адгезія, міграція.

Раніше у лабораторії імунології клітинних рецепторів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України було показано, що $\alpha 7\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ та $\alpha 4\beta 2$ субтипи nAChR локалізовані у мітохондріях, зокрема у зовнішній мембрані, де вони регулюють перший етап мітохондрійного шляху апоптозу: процес вивільнення цитохрому *c* під дією різних апоптогенних чинників. Проте, навідміну, від nAChR плазматичної мембрани, активація мітохондрійного nAChR не потребує відкриття його іонного каналу. Натомість, зв'язування як агоністів, так і антагоністів призводить до модуляції активності внутрішньомітохондрійних кіназ, задіяних у регуляції проникності зовнішньої мембрани мітохондрій.

Проте залишалось багато питань, пов'язаних з біосинтезом, функціонуванням та біологічною роллю nAChR у мітохондріях. Зокрема, не було зрозумілим, що є сигналом для направлення новосинтезованих nAChR до

мітохондрій, чи відрізняються сигнальні функції різних субодиниць nAChR та як реагують мітохондрійні nAChR на вживання нікотину, запальні процеси або пошкодження, які потребують підвищеної виживаності клітин. Враховуючи це метою роботи було встановити сигнали направлення nAChR до мітохондрій, механізми сигналювання та біологічну роль nAChR у мітохондріях. Для досягнення мети було поставлено низку завдань: 1. Дослідити вуглеводний склад мітохондрійних nAChR як один із сигналів їх спрямування до мітохондрій; 2. З'ясувати вплив нікотину на характер глікозилювання, вміст і функціонування мітохондрійних nAChR; 3. Встановити механізм сигналювання $\alpha 7\beta 2^*$ та $\alpha 3\beta 4^*$ субтипів nAChR у мітохондріях; 4. Оцінити внесок різних субтипів nAChR в регуляцію мітохондрійного шляху апоптозу; 5. Визначити роль мітохондрійних nAChR печінки при пошкодженні в результаті часткової гепатектомії; 6. Визначити вплив нейрозапалення на мітохондрійні nAChR мозку; 7. Визначити вплив аміксину та агматину на стан мітохондрій.

Для з'ясування шляхів пост-трансляційних модифікацій мітохондрійних nAChR ми порівняли вуглеводні залишки $\alpha 7$ субодиниці nAChR, що експресовані у плазматичній мембрані або у мітохондріях мозку щурів. Мітохондрійні $\alpha 7$ nAChR не відрізнялися від nAChR плазматичної мембрани за вмістом N-ацетилглюкозаміну та галактози. Натомість, вміст сіалових кислот та фукози був вищий, а манози - нижчий у $\alpha 7$ nAChR мітохондрій порівняно з $\alpha 7$ nAChR плазматичної мембрани. Саме додаткове сіалування та фукозилювання може бути сигналом для направлення молекул новосинтезованого nAChR до мітохондрій, а не до плазматичної мембрани.

Відомо, що нікотин, завдяки своїй ліпофільній природі, легко проникає через мембрани клітин і як внутрішньоклітинний «шаперон» сприяє збиранню окремих субодиниць рецептора у пентамер, фолдингу та дозріванню nAChR в процесі біосинтезу, а також посилює глікозилювання протеїнів. Вживання нікотину *per os* сприяло перерозподілу внутрішньоклітинних nAChR, особливо підтипу $\alpha 4\beta 2$, на користь мітохондрій, і це супроводжувалося посиленням фукозилювання мітохондрійних і сіалування не-мітохондрійних $\alpha 7$ субодиниць

у печінці мишей. В мітохондріях мишей, що вживали нікотин, $\alpha 7$ -специфічний агоніст (PNU-282987) або $\alpha 7$ -специфічний позитивний алостеричний модулятор (PNU-120596) менш ефективно порівняно з мітохондріями контрольних мишей пригнічували вивільнення цитохрому c, стимульоване Ca^{2+} . У свою чергу $\beta 2$ -специфічний позитивний алостеричний модулятор (dFBr) також мало ефективно (у порівнянні з мітохондріями контрольних мишей) пригнічував вивільнення цитохрому c, стимульоване вортманіном, з мітохондрій мишей, що вживали нікотин. Отримані дані свідчать про те, що вживання нікотину збільшувало глікозилювання $\alpha 7$ nAHP та сприяло посиленому направленню nAHP до мітохондрій, однак робило nAHP мітохондрій менш чутливими до дії специфічних агоністів та алостеричних модуляторів.

З використанням широкого спектру $\alpha 7$ - та $\beta 2$ -специфічних позитивних алостеричних модуляторів, було встановлено, що конформаційні зміни, викликані зв'язуванням лігандів у трансмембранному домені (переважно, між різними субодиницями), є достатніми для залучення до сигналювання внутрішньомітохондрійних кіназ. Встановлено, що $\alpha 7$ та $\beta 2$ субодиниці nAHP функціонально пов'язані з різними кіназами: $\alpha 7$ – з CaKMP, $\beta 2$ – з PI_3K . Тому стимуляція гетеромерних $\alpha 7\beta 2$ nAHP запускає обидва шляхи і є більш ефективною порівняно з дією гомомерних $\alpha 7$ nAHP.

Показано, що вкрай важливим є місце зв'язування ліганду $\alpha 3\beta 4$ субтипу nAHP: зв'язування ліганду ((\pm)-18-MC) у трансмембранному сайті між двома різними субодиницями (між $\alpha 3$ та $\beta 4$) є більш потужним сигналом, і викликані ним конформаційні зміни достатні для впливу на внутрішньомітохондрійний Src-залежний шлях сигналювання (активованій H_2O_2), тоді як зв'язування (+)-катарантину у $\beta 4/\beta 4$ -сайті активує переважно (і менш ефективно) CaKMP-залежний шлях.

На моделі нокаутних мишей було встановлено, що за відсутності $\alpha 3$, $\alpha 7$, $\beta 2$ та $\beta 4$ субодиниць nAHP стійкість мітохондрій до дії Ca^{2+} критично не знижується завдяки компенсаторній експресії $\alpha 9$ та/або $\beta 4$ субодиниць. Вперше показано наявність гетеромерного $\alpha 9\beta 4$ субтипу nAHP у мітохондріях. $\alpha 9$ -

вмісні nAХР можуть функціонально заміщати $\alpha 7$ -вмісні nAХР у $\alpha 7^{-/-}$ та $\alpha 7\beta 2^{-/-}$ мишей, сприяючи стійкості їх мітохондрій до дії Ca^{2+} .

Отримані результати вказують на те, що гетеромерні субтипи nAХР у мітохондріях мають змогу впливати на різні сигнальні шляхи апоптозу (CaКМП-, Src- та РІЗК-залежний сигнальні шляхи). Це забезпечує надійний захист мітохондрій від апоптогенних чинників різної природи, що надзвичайно важливо для біологічних процесів, які потребують підвищеного виживання клітин. У даній роботі було показано роль мітохондрійних nAХР під час фази ініціації регенерації печінки після часткової гепатектомії. Було виявлено, що через 3 години після часткової гепатектомії у мітохондріях печінки підвищувався вміст $\alpha 3$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$ та $\beta 2$ субодиниць nAХР, при цьому у цей же період мітохондрії печінки, вивільнювали менше Цит С при дії Ca^{2+} або H_2O_2 порівняно з доопераційним рівнем. Таким чином, підвищення рівнів $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 7\beta 2$ та $\alpha 9\alpha 10$ субтипів nAХР супроводжувалось збільшенням стійкості мітохондрій печінки до апоптогенних стимулів.

Відомо, що nAХР залучені до розвитку багатьох порушень нервової системи, зокрема хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона, епілепсії та інших. Ці хвороби також супроводжуються гострими або хронічними запальними процесами. Показано, що нейрозапалення має патогенний вплив на експресію та функціонування мітохондрійних nAХР мозку, зокрема знижувався вміст $\alpha 7$ субодиниць nAХР у мітохондріях мозку, а мітохондрії вивільняли більше Цит С при дії Ca^{2+} і ставали менш чутливими до впливу $\alpha 7$ -специфічного агоніста PNU282987, ніж мітохондрії контрольних тварин. Отримані нами дані показують, що мітохондрійні nAХР швидко реагують на стимули запалення, що робить мітохондрії менш стійкими до апоптогенного впливу і сприяє розвитку патологічних процесів в мозку. N-стероїлетаноламін, ендоканабіноїд ссавців, може запобігати патологічному ефекту нейрозапалення, покращувати когнітивний стан піддослідних мишей, в тому числі, стабілізуючи мітохондрії мозку.

Інші фармакологічні агенти, аміксин та агматин, що зв'язуються неподалік ортостеричного сайту nAChR, також чинили слабкий проти-апоптотичний ефект на мітохондрії мозку та печінки, знижуючи кількість цитохрому *c*, що вивільнявся під дією апоптогенних доз Ca^{2+} .

Результати проведених досліджень показали, що nAChR, що локалізовані у мітохондріях, експресуються у гетеромерних комбінаціях, завдяки чому забезпечується зв'язок одного субтипу nAChR одночасно з декількома різними внутрішньомітохондрійними сигнальними шляхами. Це, свою чергу, дозволяє мітохондріям ефективно протистояти апоптогенним чинникам різної природи, а відтак захищає клітини від апоптозу внаслідок відкриття мітохондрійної пори. Найбільш значущу роль мітохондрійні nAChR відіграють у біологічних процесах, в яких потребується підвищена виживаність клітин.

Ключові слова: нікотинний ацетилхоліновий рецептор, мітохондрії, апоптоз, позитивні алостеричні модулятори, цитохром *c*, часткова гепатектомія, нейрозапалення.

SUMMARY

Uspenska K.R. "The mechanisms of signaling and the biological role of nicotinic acetylcholine receptors in mitochondria". – Qualification scientific work, the manuscript.

Thesis for a candidate degree in biological sciences (Doctor of Philosophy), specialty 03.00.04 "Biochemistry". – O. V. Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2018.

Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are ligand-gated ion channels, which consist of five identical or different subunits (homo- or heteropentamers, respectively). nAChRs localized in the outer membrane of excitable cells, are involved in signaling in neuromuscular and nerve synapses. Neuronal type of

nAChRs is also expressed in many non-excitabile cells (hepatocytes, epithelial cells, keratinocytes, immune cells, astrocytes). nAChRs of non-excitabile cells are involved in the regulation of such important cell functions as survival, mobility, adhesion, migration.

Previously in the laboratory of immunology of cell receptors at the O. V. Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine it was showed that $\alpha 7\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ and $\alpha 4\beta 2$ nAChR subtypes are localized in the outer membrane of mitochondria, where they regulate the first stage of the mitochondrial pathway of apoptosis: the process of the cytochrome c release under various apoptotic factors. However, in contrast with nAChRs of the plasma membrane, the activation of the mitochondrial nAChRs does not require the opening of its ion channel. Instead, the binding of agonists and antagonists leads to modulation of the activity of intra-mitochondrial kinases involved in regulation of the permeability of the outer membrane of mitochondria.

However, many issues with biosynthesis, the functioning and the biological role of nAChR in mitochondria remained unclear. Among others, it was unclear what is a signal to target newly synthesized nAChRs to mitochondria, whether different nAChRs subunits differ in signaling, and how mitochondrial nAChRs react to nicotine use, inflammatory processes or injuries that require enhanced cell survival. Regarding these issues, the aim of the work was to establish the signals targeted nAChRs to mitochondria, the signaling mechanisms and biological role of nAChRs in mitochondria. To achieve the goal were pointed out a number of tasks: 1. To study the carbohydrate composition of mitochondrial nAChRs as one of the signals of their targeting to the mitochondria; 2. To find out the effect of nicotine on the glycosylation, the content and the functioning of mitochondrial nAChRs; 3. To establish the signaling mechanism of $\alpha 7\beta 2$ * and $\alpha 3\beta 4$ * nAChR subtypes in mitochondria; 4. To assess the contribution of various nAChR subtypes in the regulation of the mitochondrial pathway of apoptosis; 5. To determine the role of mitochondrial nAChRs in the damaged liver as a result of partial hepatectomy; 6. To

determine the effect of the neuroinflammation on the mitochondrial nAChR in the brain; 7. To determine the effect of amixin and agmatine on the state of mitochondria.

To find out the pathways of post-translational modifications of mitochondrial nAChRs, we compared the carbohydrate residues of $\alpha 7$ nAChR subunit localized in the plasma membrane or in mitochondria in rat brain. The mitochondrial $\alpha 7$ nAChR didn't differ from nAChR in the plasma membrane by the content of N-acetylglucosamine and galactose. Instead, the content of sialic acids and fucose was higher, and mannose was lower in mitochondrial $\alpha 7$ nAChRs than in the $\alpha 7$ nAChRs of the plasma membrane. The extra sialiation and fucosylation might be a signal targeting the newly synthesized nAChR molecule to the mitochondria instead to the plasma membrane.

Due to its lipophilic nature, nicotine easily penetrates through cell membranes and as an intracellular "chaperone" promotes the assembling of subunits of the receptor to the pentamer, the folding and the maturation of nAChRs in the process of biosynthesis, and also enhances protein glycosylation. The use of nicotine per os contributed to the redistribution of intracellular nAChR, especially the $\alpha 4\beta 2$ subtype, in favor of mitochondria, and this process was accompanied by increased fucosylation of the mitochondrial and sialiation of the non-mitochondrial $\alpha 7$ subunits in the mice liver. The $\alpha 7$ -specific agonist (PNU-282987) or the $\alpha 7$ -specific positive allosteric modulator (PNU-120596) inhibited Ca^{2+} -stimulated cytochrome c release less effective from the mitochondria of mice consumed nicotine than from the mitochondria of control mice. The $\beta 2$ -specific positive allosteric modulator (dFBr) also had a little effect (compared with mitochondria of control mice) inhibiting the wortmannin-stimulated cytochrome c release from the mitochondria of mice consumed nicotine. These results suggested that nicotine consumption enhanced glycosylation of the $\alpha 7$ nAChRs and promoted a targeting of the nAChRs to mitochondria, but made mitochondrial nAChRs less sensitive to specific agonists and allosteric modulators.

Using a wide range of $\alpha 7$ - and $\beta 2$ -specific positive allosteric modulators, it has been found that conformational changes caused by ligand binding in a

transmembrane domain (preferably between two different subunits) are sufficient to involve intra-mitochondrial kinases for signaling. $\alpha 7$ and $\beta 2$ nAChR subunits are functionally linked to different kinases: $\alpha 7$ - to CaKMII, $\beta 2$ – to PI3K. Therefore, the stimulation of heteromeric $\alpha 7\beta 2$ nAChRs triggers both pathways and is more effective compared to the homogeneous $\alpha 7$ nAChRs.

It has been shown that for the $\alpha 3\beta 4$ subtype of nAChR, the localization of binding site of a ligand is important: ligand binding ((\pm)-18-MC) in a transmembrane site between two different subunits (between $\alpha 3$ and $\beta 4$) triggers more powerful signal, and the following conformational changes are sufficient to affect the intramitochondrial Src-dependent signaling pathway (activated by H₂O₂), while the binding of (+)-catarantine to the $\beta 4/\beta 4$ site activates (and less effectively) a CaKMII-dependent pathway.

In knockout mice, it was found that the absence of $\alpha 3$, $\alpha 7$, $\beta 2$ and $\beta 4$ subunits of nAChRs, doesn't affect critically the stability of mitochondria to the effect of Ca²⁺ due to the compensatory expression of $\alpha 9$ and/or $\beta 4$ subunits. This is the first time when the presence of a heteromeric $\alpha 9\beta 4$ nAChR subtype was shown. $\alpha 9$ -containing nAChRs can functionally replace $\alpha 7$ -containing nAChRs in $\alpha 7^{-/-}$ and $\alpha 7\beta 2^{-/-}$ mice, contributing to the resistance of their mitochondria to the effect of Ca²⁺.

The results showed that heteromeric nAChR subtypes in mitochondria can affect various signaling pathways of apoptosis (CaKMII-, Src- and PI3K-dependent signaling pathways). This mechanism provides reliable protection of mitochondria from different apoptotic factors that is extremely important for biological processes that require enhanced cell survival. In this study, the role of mitochondrial nAChRs in the phase of initiation of liver regeneration after partial hepatectomy was shown. It was found that after 3 hours after partial hepatectomy in liver mitochondria, the content of $\alpha 3$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$ and $\beta 2$ subunits of nAChR increased, while at the same time point the mitochondria released less cytochrome c under Ca²⁺ or H₂O₂ compared with mitochondria from liver before surgery. Thus, the rise of $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 7\beta 2$ and $\alpha 9\alpha 10$ nAChR subtypes was accompanied with an increase of the resistance of the liver mitochondria to apoptotic stimuli.

nAChRs are involved in the development of many nervous system disorders, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, epilepsy, and others. These diseases are accompanied by acute or chronic inflammatory processes. It was shown that neuroinflammation has a pathogenic effect on the expression and functioning of the mitochondrial nAChRs in the brain, in particular, the content of mitochondrial $\alpha 7$ nAChR subunits in brain decreased, while the mitochondria released more cytochrome c under Ca^{2+} and were less susceptible to the $\alpha 7$ -specific agonist PNU282987 than the mitochondria of control animals . Our data showed that mitochondrial nAChRs responded quickly to stimuli of inflammation, that made mitochondria less resistant to apoptotic effects and contributed to the development of pathological processes in the brain. N-steroylethanolamine, a mammalian endocannabinoid, can prevent the pathological effect of neuroinflammation, improve the cognitive status of the mice, including stabilizing brain mitochondria.

Other pharmacological agents, amixin and agmatine, binding close to the orthosteric site of the receptor, also had a weak anti-apoptotic effect on brain and liver mitochondria, reducing the amount of cytochrome c released by the effects of apoptotic Ca^{2+} doses.

The results of the study showed that mitochondrial nAChRs are expressed in heteromeric combinations, thereby ensuring the link of one nAChR subtype with several different intra-mitochondrial signaling pathways. This link allows mitochondria to effectively withstand different apoptotic factors, and thus protects cells from apoptosis as a result of the opening of mitochondrial pores. The most important role of mitochondrial nAChR plays in biological processes that require increased cell survival.

Keywords: nicotinic acetylcholine receptors, mitochondria, apoptosis, positive allosteric modulators, cytochrome c, partial hepatectomy, neuroinflammation.

Список публікацій здобувача за темою дисертації:

1. **Uspenska K**, Lykhmus O, Obolenska M, Pons S, Maskos U, Komisarenko S, Skok M. Mitochondrial nicotinic acetylcholine receptors support liver cells viability after partial hepatectomy. *Frontiers in Pharmacology*, 2018; 9, art. 626:1-12.
2. **Uspenska K**, Lykhmus O, Arias HR, Pons S, Maskos U, Komisarenko S, Skok M. Positive allosteric modulators of $\alpha 7^*$ or $\beta 2^*$ nicotinic acetylcholine receptors trigger different kinase pathways in mitochondria. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2018; 9: 226–235.
3. Arias HR, Lykhmus O, **Uspenska K**, Skok M. Coronaridine congeners modulate mitochondrial $\alpha 3\beta 4^*$ nicotinic acetylcholine receptors with different potency and through distinct intra-mitochondrial pathways. *Neurochemistry International*, 2018; 114:26-32.
4. **Uspenska K**, Lykhmus O, Gergalova G, Chernyshov V, Arias HR, Komisarenko S, Skok M. Nicotine facilitates nicotinic acetylcholine receptor targeting to mitochondria but makes them less susceptible to selective ligands. *Neurosci Lett.*, 2017; 656:43-50.
5. Lykhmus O, **Uspenska K**, Koval L, Lytovchenko D, Voytenko L, Horid'ko T, Kosiakova H, Gula N, Komisarenko S, Skok M. N-stearoylethanolamine protects the brain and improves memory of mice treated with lipopolysaccharide or immunized with the extracellular domain of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Int Immunopharmacol*, 2017; 52:290-296.
6. Skok M, Gergalova G, Lykhmus O, Kalashnyk O, Koval L, **Uspenska K**. Nicotinic acetylcholine receptors in mitochondria : subunit composition, function and signaling. *Neurotransmitter*, 2016, 3: e1290.
7. Lykhmus O, Mishra N, Koval L, Kalashnyk O, Gergalova G, **Uspenska K**, Komisarenko S, Soreq H, Skok M. Molecular Mechanisms Regulating LPS-Induced Inflammation in the Brain. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2016, 9(19): 1-13.

8. **Uspenska KR**, Gergalova GL, Lykhmus OYu, Skok MV. The effect of amixin and agmatine on cytochrome c release from isolated mitochondria. The Ukrainian Biochemical Journal, 2016; 88 (1): 5-10.

Апробація матеріалів дисертації:

1. **Середницька К.Р.**, Гергалова Г.Л., Лихмус О.Ю., Скок М.В. Препарати Аміксин та агматин впливають на функціонування нікотинового ацетилхолінового рецептора мітохондрій. Матеріали *XI з'їзду Українського біохімічного товариства*; 2014 Жов 6-10; Україна, Київ; Ukr.Biochem.J., 2014; 86(5,Suppl.2), с. 137.
2. **Успенська К.Р.**, Лихмус О.Ю. Субодичний склад та функціонування нікотинових ацетилхолінових рецепторів у мітохондріях мишей нокаутних за генами $\alpha 3$, $\alpha 7$, $\beta 2$ або $\beta 4$ субодичниць. Матеріали конф.-конкурсу молодих учених «*Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016*»; 2016 Трав 26-27; Україна, Київ; 2016. с. 53.
3. Skok M, Lykhmus O, Koval L, **Uspenska K**. The key role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in neuroinflammation and memory impairment. Матеріали міжнр. симп. «*XVth International Symposium on Cholinergic Mechanisms*»; 2016 Жов 16-20; Франція, Марсель, 2016. с. 35.
4. **Uspenska K**, Lykhmus O, Arias HR, Maskos U, Skok MV. Nicotinic acetylcholine receptors in mitochondria: structure, origin, mode of functioning. Матеріали міжнр. конгресу «*41st FEBS Congress*». The FEBS Journal, 2016; 283(Suppl. 1), 2016. с. 434.
5. **Uspenska K**, Lykhmus O, Skok M. Functioning and physiological role of nicotinic acetylcholine receptors in mitochondria. Матеріали міжнр. конф. «*Conference of Young Scientists*»; 2017 Чер 6-9; Україна, Київ. Ukr.Biochem.J. 2017, 89(3), с.111.
6. **Uspenska K**, Lykhmus O, Skok M. Nicotine facilitates nicotinic acetylcholine receptor targeting to mitochondria but makes them less susceptible to specific

ligands. Матеріали міжнр. конгресу «*42nd FEBS Congress*»; 2017 Вер 10-14; Ізраїль, Єрусалим; *The FEBS Journal*, 2017, 284 (Suppl. 1), с. 151

7. **Uspenska K**, Lykhmus O, Obolenska M, Maskos U, Skok M. Mitochondrial nicotinic acetylcholine receptors: physiological value and mechanism of functioning. Матеріали міжнр.конф. “*Nicotinic Acetylcholine Receptors 2017*”; 2017 Тра 7-11; Греція, Крит; 2017, с. S47.

8. **Uspenska KR**. Biological role of nicotinic acetylcholine receptors in mitochondria. Матеріали міжнр. конф. мол. уч. «*FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference*»; 2018 Вер 3-5; Україна, Київ. – *Ukr. Biochem. J.*, 2018, 90(3), с. 106.

9. **Uspenska K**, Lykhmus O, Skok MV. Role of Mitochondrial Nicotinic Acetylcholine Receptors in Knock-Out Mice and after Partial Hepatectomy in Rats. Матеріали міжнр. симп. мол. уч. “*15th Horizons in molecular biology*”; 2018 Вер 10-13; Німеччина, Геттінген; 2018, с. 175.

ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень	17
Вступ.....	17
Розділ 1. Огляд літератури.....	24
1.1. Нікотинові ацетилхолінові рецептори (nAChR).....	24
1.1.1. Структура та функціонування nAChR.....	24
1.1.2. Ліганди nAChR	34
1.1.3. Патології нервової системи, пов'язані з функціями nAChR.....	38
1.2. Мітохондрії.....	43
1.2.1. Будова мітохондрій.....	43
1.2.2. Мітохондрії і апоптоз	45
1.2.3 nAChR в мітохондріях.....	49
Розділ 2. Матеріали і методи досліджень	54
2.1. Експериментальні тварини.....	54
2.2. Матеріали та реактиви	54
2.3. Виділення та характеристика мітохондрійної фракції та фракції збідненої на мітохондрії	55
2.4. Отримання препаратів лізатів мітохондрійної фракції та фракції збідненої на мітохондрії	56
2.5. Дослідження субодиничного складу nAChR методом Сендвіч- ІФА.....	56
2.6. Дослідження вивільнення цитохрому c з мітохондрій із використанням Сендвіч-ІФА.....	57
2.7. Дослідження складу вуглеводного компоненту nAChR методом Сендвіч-лектин-ІФА	58
2.8. Дослідження впливу нікотину на nAChR мітохондрій печінки мишей.....	59
2.9. Моделювання часткової гепатектомії та лапаротомії.....	59
2.10. Дослідження впливу гострого запалення на мітохондрійні nAChR.....	60

2.11. Дослідження впливу N-стероїлетаноламіну (NSE) на мітохондрійні нАХР.....	60
2.12. Поведінковий тест «Розпізнавання нового об'єкту».....	61
2.13. Статистичний аналіз експериментальних даних.....	61
Розділ 3. Результати та обговорення	63
3.1. Будова мітохондрійних нАХР. Сигнал для направлення нАХР у мітохондрії	63
3.1.1. Дослідження вуглеводного компонента нАХР плазматичної мембрани та мітохондрій.....	63
3.1.2. Дослідження впливу нікотину на субодиничний та вуглеводний склад і функціонування нАХР у мітохондріях печінки.....	65
Роботи, в яких опубліковані основні наукові результати підрозділу.....	73
3.2. Механізми сигналювання нАХР у мітохондріях	74
3.2.1. Механізм сигналювання $\alpha 7\beta 2^*$ нАХР у мітохондріях	74
3.2.2. Механізм сигналювання $\alpha 3\beta 4^*$ нАХР у мітохондріях.....	87
Роботи, в яких опубліковані основні наукові результати підрозділу.....	95
3.3. Біологічна роль нАХР мітохондрій.....	96
3.3.1. Відсутність $\alpha 3$, $\alpha 7$, $\beta 2$ та $\beta 4$ субодиниць нАХР не критично впливає на чутливість мітохондрій до дії Ca^{2+}	96
3.3.2. Підвищений вміст $\alpha 9$ та $\beta 4$ субодиниць нАХР у мітохондріях $\alpha 7^{-/-}$, $\alpha 7\beta 2^{-/-}$ та $\alpha 3^{+/-}$ нокаутних мишей підтримують стійкість мітохондрій до Ca^{2+}	99
3.3.3. Мітохондрійні нАХР підтримують життєздатність клітин печінки після часткової гепатектомії.....	103
3.3.4. Дослідження впливу запалення на мітохондрійні нАХР мозку....	112
3.3.5. Дослідження впливу N-стеароїлетаноламіну на стан мітохондрійних нАХР	116
3.3.6. Дослідження впливу Аміксину і агматину на вивільнення цитохрому с під дією Ca^{2+}	119
Роботи, в яких опубліковані основні наукові результати підрозділу.....	123

Аналіз та узагальнення результатів.....	125
Висновки	130
Список використаних джерел	132
Додаток 1. Список публікацій за темою дисертаційної роботи.....	161

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ANT (adenine nucleotide translocase) - транслоказа аденінового нуклеотиду

CaКМІІ – кальцій-кальмодулінзалежна кінза ІІ типу

MAC (mitochondrial apoptosis-induced channel) – мітохондрійний апоптоз-індукований каналу

MIR (Main Immunogenic Region) – головний імуногенний регіон

mPTP (mitochondria permeability transition pore) – мітохондрійна пора перехідної провідності

NSE (N-steroilethanolamine) – N-стероїлетаноламін

VDAC (voltage-dependent anion channel) – потенціал-залежний аніонний канал

A β (Amiloid β) – бета-амілоїд

AХ – ацетилхолін

БСА – бичачий сироватковий альбумін

ГАМК – гама-аміномасляна кислота

ЕПР - ендоплазматичний ретикулум

ЛП – лапаротомія

ЛПС (lipopolysaccharide, LPS) – ліпополісахарид

МЛА – метиллікаконтин

НАМ – негативний алостеричний модулятор

НАХР – нікотинівий ацетилхоліновий рецептор

ОФД - ортофенилендіамин

ПАМ - позитивний алостеричний модулятор

Сендвіч-ІФА – Сендвіч імуноферментний аналіз

СТ – синдром Туретта

ХА – хвороба Альцгеймера

ХП – хвороба Паркінсона

Цит С – цитохром с

ЧГЕ – часткова гепатектомія

ВСТУП

Актуальність теми. Нікотинові ацетилхолінові рецептори (nAChR) є ліганд-залежними іонними каналами. За класичними уявленнями, вважалось, що вони експресуються виключно на зовнішній мембрані збудливих клітин, де беруть участь у передачі сигналів у нервово-м'язових або нервових синапсах. Проте пізніше nAChR були ідентифіковані на багатьох інших, незбудливих клітинах (епітеліальних, кератиноцитах, лімфоцитах, астроцитах, гепатоцитах), де вони регулюють життєво необхідні клітинні функції: виживання, рухливість, адгезію, міграцію тощо [1], [2]. Дослідженнями лабораторії імунології клітинних рецепторів Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України було показано, що $\alpha 7\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ та $\alpha 4\beta 2$ субтипи nAChR експресуються у зовнішній мембрані мітохондрій і регулюють процес вивільнення цитохрому c під дією різних апоптогенних чинників, що є ключовим етапом мітохондрійного шляху апоптозу [3]. Було з'ясовано, що активація мітохондрійного nAChR не потребує відкриття його іонного каналу. Натомість, зв'язування як агоністів, так і антагоністів призводить до модуляції активності внутрішньомітохондрійних кіназ, задіяних у регуляції проникності зовнішньої мембрани мітохондрій [4]. Проте залишалось багато питань, пов'язаних з біосинтезом, функціонуванням та біологічною роллю nAChR у мітохондріях. Зокрема, не було зрозумілим, що є сигналом для направлення новосинтезованих nAChR до мітохондрій, чи відрізняються сигнальні функції різних субодиниць nAChR та як реагують мітохондрійні nAChR на вживання нікотину, запальні процеси або пошкодження, які потребують підвищеної виживаності клітин. Ці питання стали предметом досліджень дисертаційної роботи і визначають її актуальність.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у відділі молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України протягом 2014–2018 рр. у рамках

планових досліджень за бюджетною темою: «Вивчення структури і функцій протеїнів і пептидів та їх використання для біомедицини» (ДР№ 0114U003216, 2014-2018рр.). Частину роботи було виконано на базі лабораторії Інтегративної нейробиології холінергічних систем відділу нейронаук Інституту Пастера (Париж, Франція) за підтримки короткотермінової стипендії для країн Центральної та Східної Європи від Федерації Європейських біохімічних товариств (ФЕБС). Роботу було підтримано також стипендією Президента України для молодих вчених (2016-2018рр.).

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи було встановити сигнали направлення nAHP до мітохондрій, механізми сигналювання та біологічну роль nAHP у мітохондріях.

Відповідно до мети було сформульовано наступні завдання:

1. Дослідити вуглеводний склад мітохондрійних nAHP як один із сигналів їх спрямування до мітохондрій.
2. З'ясувати вплив нікотину на характер глікозилювання, вміст і функціонування мітохондрійних nAHP.
3. Встановити механізм сигналювання $\alpha 7\beta 2^*$ та $\alpha 3\beta 4^*$ субтипів nAHP у мітохондріях.
4. Оцінити внесок різних субтипів nAHP в регуляцію мітохондрійного шляху апоптозу.
5. Визначити роль мітохондрійних nAHP печінки при пошкодженні в результаті часткової гепатектомії.
6. Визначити вплив нейрозапалення на мітохондрійні nAHP мозку.
7. Визначити вплив агматину та Аміксину на стан мітохондрій.

Об'єкт дослідження: мітохондрії печінки та мозку мишей лінії C57Bl/6, мишей, нокаутних за генами $\alpha 7^{-/-}$, $\alpha 3^{-/+}$, $\alpha 7\beta 2^{-/-}$, $\beta 4^{-/-}$ субодиниць nAHP, а також щурів лінії Вістар.

Предмет дослідження: механізм направлення, сигналювання та біологічна роль nAHP у мітохондріях.

Методи дослідження: препаративна біохімія, Сендвіч-ІФА, Сендвіч-лектин-ІФА, ДСН-електрофорез, поведінковий тест розпізнавання нового об'єкту, методи статистичного аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше було показано, що сигналювання мітохондрійних nAHR за іон-незалежним механізмом ініціюється конформаційними змінами молекули рецептора, причому різні субодиниці стимулюють активацію різних сигнальних шляхів, що визначає доцільність експресії гетеромерних nAHR в мітохондріях. Вперше показано відмінність вуглеводного складу nAHR плазматичної мембрани та мітохондрій, що може бути одним із сигналів для направлення nAHR у різні компартменти клітини. Було показано, що вживання нікотину, посилюючи глікозилування nAHR, сприяє їх направленню до мітохондрій, але при цьому перешкоджає зв'язуванню специфічних лігандів. Вперше показано участь nAHR у підтриманні виживання клітин печінки після часткової гепатектомії та патогенний вплив нейрозапалення на експресію та функціонування мітохондрійних nAHR мозку. Отримані результати є важливими для розуміння функціонування нікотинових ацетилхолінових рецепторів у мітохондріях.

Достовірність одержаних результатів забезпечено застосуванням адекватних експериментальних підходів, підтверджено аналізом точності та похибок вимірювань, відтворюваністю одержаних експериментальних даних.

Практичне значення роботи. У роботі показано, що рівень експресії та склад мітохондрійних nAHR визначає стійкість мітохондрій до дії апоптогенних чинників. Відповідно, при нейрозапаленні, що супроводжується зниженням кількості мітохондрійних nAHR, мітохондрії мозку стають більш уразливими до апоптогенного впливу, а при частковій гепатектомії, навпаки, експресія мітохондрійних nAHR підвищується і підвищує апоптогенну стійкість мітохондрій печінки. Таким чином, активація мітохондрійних nAHR сприяє виживаності клітин за критичних умов. Визначення ефективності алостеричних модуляторів для активації nAHR у мітохондріях може бути основою для пошуку нових терапевтичних підходів для підтримки життєздатності клітин

при нейродегенеративних захворюваннях та інших патологіях, що супроводжуються активацією процесів апоптозу.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота – завершене дослідження, виконане автором відповідно до програми експериментальних досліджень, спланованих і проведених протягом 2014 – 2018 рр. Постановка наукових задач, аналіз та інтерпретація одержаних результатів, підготовка до друку публікацій проводились у співпраці з науковим керівником – академіком НАН України, д.б.н. М.В. Скок. Дисертантом особисто здійснено пошук і аналіз даних літератури, проведено значну частину досліджень і аналіз отриманих даних, сформульовано основні положення та висновки. Дослідження з використанням ДСН-електрофорезу та функціональні тести на стійкість мітохондрій до апоптогенних чинників автором виконано самостійно; експерименти з імуноферментного аналізу та поведінкового тесту виконано спільно зі ст.н.с. відділу молекулярної імунології, к.б.н. О. Ю. Лихмус. Проведення операцій з часткової гепатектомії та лапаротомії виконано завідувачкою відділу системної біології Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, д.б.н. М. Ю. Оболенською. Нокаутних мишей було надано доктором У. Маскосом з Інституту Пастера (Париж, Франція). Проведення експериментів з введення N-стероїлетаноламіну виконано спільно з співробітниками відділу біохімії ліпідів к.б.н. Косяковою Г. В. та к.б.н. Горідько Т. М. Молекулярний докінг-аналіз проведений у лабораторії доктора Х.Аріаса (Аргентина).

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації були представлені на XI з'їзді Українського біохімічного товариства (Київ, Україна, 2014), XVth International Symposium on Cholinergic Mechanisms (Марсель, Франція, 2016), Конференції молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології» (Київ, Україна, 2016 та 2018), Конференції молодих учених відділення біології та біохімії НАН України (Київ, Україна, 2017), 41-му та 42-му Конгресі ФЕБС та 17-ому Форумі молодих вчених (Кушидасі, Турція, 2016; Єрусалим, Ізраїль, 2017), Літній школі з клітинної біоенергетики (Львів,

Україна, 2017), Німецько-українському форумі молодих вчених (Київ-Львів, Україна, 2017), міжнародній конференції “Nicotinic Acetylcholine Receptors 2017” (Крит, Греція, 2017), 11-ій Парнасівській конференції (Київ, Україна, 2018), 15-ому Міжнародному симпозиумі аспірантів “Horizons in Molecular Biology” (Геттінген, Німеччина, 2018), а також доповідались на наукових семінарах Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України та відділу молекулярної імунології.

Публікації. За темою дисертації опубліковано 17 наукових праць, з яких 8 статей, з них 7 у міжнародних періодичних фахових наукових виданнях, і 9 тез доповідей у збірках вітчизняних та міжнародних конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 163 сторінках машинописного тексту. Дисертація складається з таких розділів: «Вступ», «Огляд літератури» (2 підрозділи), «Матеріали і методи досліджень» (13 підрозділів), «Результати та їх обговорення» (3 підрозділи), «Аналіз та узагальнення результатів», «Висновки», «Список використаних джерел» (271 посилань). Роботу проілюстровано 43 рисунками та 5 таблицями.

Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Нікотиніві ацетилхолінові рецептори (nAChR)

1.1.1. Структура та функціонування nAChR

Нікотиніві ацетилхолінові рецептори належать до родини пентамерних ліганд-залежних іонних каналів [5]. До цієї родини також належать серотонінові рецептори 5-HT₃ типу, GABA_{A/C} та гліцинові рецептори, а також рецептори деяких безхребетних та прокариотів [6]. Ці рецептори також називають рецепторами, що містять Цис-петлю, тому що мають 13-14 консервативних залишків, що замкнені залишками цистеїну в N-кінцевому домені кожної субодиниці; цей дисульфідний місток, однак, відсутній у рецепторів прокариотів.

Вперше nAChR був виділений з електричного органу ската *Torpedo marmorata* і охарактеризований [3, 4]. nAChR – це глікопротеїд, пентамерний комплекс з молекулярною масою близько 300 кДа. За даними електронної мікроскопії, висота nAChR складає 12 нм, рецептор виступає в позаклітинний простір на 6 нм, до цитоплазми – на 2 нм. Максимальний діаметр рецептора 7 нм. Субодиниці розташовані перпендикулярно до клітинної мембрани навколо осі симетрії, формуючи канал діаметром 1,0 – 1,5 нм у верхній частині. Донизу канал звужується. Сайт зв'язування ацетилхоліну розташований на відстані приблизно 3 нм над мембраною [9].

У 2001 році біло відкрито і кристалізовано водорозчинний ацетилхолін-зв'язуючий білок із равлика *Lymnaea stagnalis* [10], що значно спросило дослідження структури nAChR [11]. Ацетилхолін-зв'язуючий білок – це гомолог N-кінцевого ліганд-зв'язуючого домену нікотинового рецептора. За принципом гомології була змодельована структура позаклітинного домену nAChR, який є подібним для всіх α субодиниць (Рис 1.1).

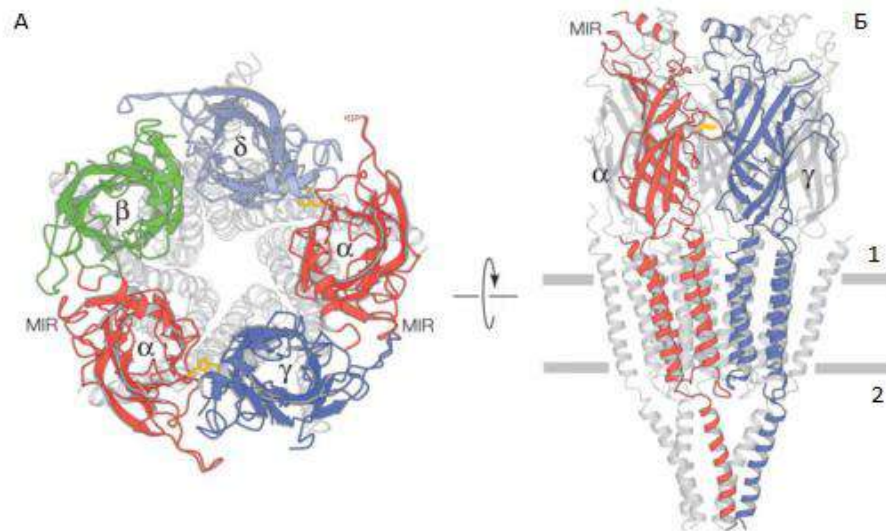


Рис. 1.1. Будова нікотинного ацетилхолінового рецептора, представлена у вигляді стрічкової діаграми: А – вид зверху (кольором позначені надмембранні частини різних субодиниць), Б – вид збоку (кольором позначено дві субодиниці. 1 – позаклітинний простір, 2 – внутрішньоклітинний простір. MIR (*Main Immunogenic Region*) – головний імуногенний регіон [8].

У 2016 році вперше було експресовано функціональний $\alpha 7$ nAChR у *Escherichia coli* [12].

У хребетних nAChR поділяють на два типи: скелетно-м'язовий і нейрональний [13]. Скелетно-м'язовий тип рецептора складається з $\alpha 1$, $\beta 1$, γ , δ , (ϵ на стадії ембріональних форм) субодиниць у співвідношенні 2:1:1:1 та експресується в електричних органах риб та м'язових тканинах вищих тварин.

Нейрональний тип рецептора представлений гомо- або гетеропентамерною комбінацією 12 різних субодиниць: $\alpha 2 - \alpha 10$ і $\beta 2 - \beta 4$ [14], [15]. Ці рецептори експресуються як у нервових клітинах, так і в клітинах, що відносять до незбудливих (гепатоцити, епітеліоцити, лімфоцити). Гетеромерні nAChR є комбінацією α і β субодиниць, а гомомерні – лише $\alpha 7$, $\alpha 8$ або $\alpha 9$ субодиниць [5]. Виключенням є, $\alpha 9\alpha 10$ субтип nAChR, який формує гетеропентамер виключно з α субодиниць [16]. Розрізняють такі гетеромерні субтипи рецептора: $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3(\alpha 5)\beta 4$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 4\beta 4$, $\alpha 6\beta 3$, $\alpha 9\alpha 10$, $\alpha 4\alpha 5\beta 2$, $\alpha 3\beta 3\beta 4$, $\alpha 6\alpha 4\beta 2\beta 3$.

Кожна субодиниця nAХР складається з шести структурних компонентів: 1 – сигнальна послідовність, яка відщеплюється після транслокації N-термінального домену синтезованого поліпептидного ланцюга до зовнішньої поверхні ендоплазматичного ретикулума; 2 – великий позаклітинний N-термінальний домен, що має цистеїнову петлю та містить сайти глікозилування і зв'язування агоністів та антагоністів; 3 – три гідрофобні трансмембранні фрагменти (M1 – M3); 4 – цитоплазматичний домен, що містить сайти фосфорилування, зв'язування з іншими білками; 5 – четвертий трансмембранний фрагмент (M4); 6 – короткий позаклітинний C-термінальний домен. Довжина поліпептидного ланцюга кожної з субодиниць від 421–437 (α) до 501 (δ) амінокислот [17] (Рис 1.2).

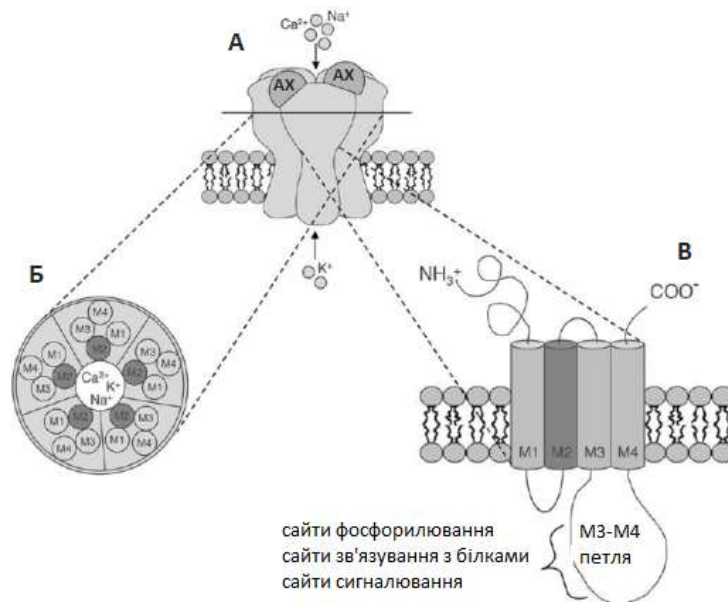


Рис. 1.2. Будова nAХР. *A* – загальна будова рецептору: АХ – ацетилхолін; *B* – схематичне зображення п'яти субодиниць nAХР, які формують канал; *C* – схематичне зображення розташування доменів однієї з субодиниць nAХР M1, M2, M3, M4 – трансмембранні домени молекули рецептора [18].

N-термінальний домен (позаклітинний) сформований β -бочкою, яка складається з 10 β -складок, та однієї α -спіралі. У складі N-термінального домену за межами β -бочки виділяють ще вісім петель: А-, В-, С-, Е-, D- та F-петлі, Цис- та $\beta 1$ - $\beta 2$ -петлі, які беруть участь у функціонуванні рецептора. С-

петля за структурою є $\beta 9$ - $\beta 10$ шпилькою та відіграє особливо важливу роль в утворенні зв'язку рецептора з ацетилхоліном [8] (Рис 1.3).

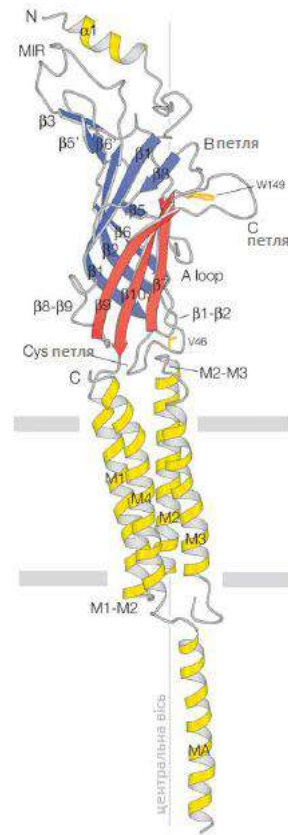


Рис. 1.3. Схематичне зображення однієї α субодиниці нікотинного ацетилхолінового рецептора: вид на рецептор перпендикулярно площині мембрани клітини. MIR (*Main Immunogenic Region*) – головний імуногенний регіон. На зображенні відсутній регіон M3-M4 [8].

Позаклітинний домен nAChR глікозилюваний. 70% вуглеводних залишків, які входять до складу рецептора, є залишками манози. Цис-петля також містить високо консервативний сайт глікозилювання Асп-Х-Сер/Тре.

Трансмембранні фрагменти субодиниць nAChR, які розташовані у гідрофобній частині мембрани, є дуже подібними [19]. Натомість, найбільш варіабельними є цитоплазматичні домени субодиниць, які, власне, визначають специфічність сигналів від кожного субтипу рецептора.

Ділянки, у яких відбувається безпосереднє зв'язування агоністів та конкурентних антагоністів рецептора, розташовані на α -субодиницях.

Субодиниці β , δ , ϵ , що не мають сайтів зв'язування агоністів та антагоністів, називають «структурними». Також припускають, що у випадку формування $\alpha 9\alpha 10$ субтипу nAChR, «структурною» субодиницею вважають $\alpha 10$ субодиницю [20]. Відповідно, гетеромерні рецептори, які містять по дві α субодиниці, мають два сайти зв'язування ацетилхоліну, а α гомомерні пентамери – п'ять (Рис. 1.4).

Іонний канал сформовано трансмембранними ділянками – α -спіральними M2 сегментами всіх п'яти субодиниць, – а передача сигналу від рецептора всередину клітини і зв'язування з цитоскелетом опосередковується великим цитоплазматичним доменом. Субодиниці поєднуються одна з одною нековалентно [8].

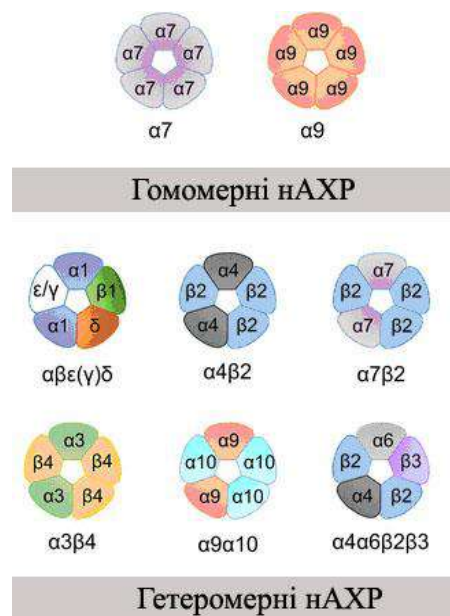


Рис. 1.4. Схематичне зображення варіантів комбінації субодиниць nAChR у пентамери nAChR [21].

Зв'язування агоністу із позаклітинною частиною nAChR призводить до певних конформаційних перетворень всієї молекули пентаметру. Після зв'язування ліганду структура рецептора змінюється таким чином, що відкриття іонного каналу відбувається за мікросекунди. Процес зв'язування ліганду, що викликає рух субодиниць, необхідний для відкриття каналу nAChR, був досліджений методом комп'ютерного моделювання. Створена модель показує, що коли АХ або нікотин зв'язується з nAChR, відбувається перегрупування водневих зв'язків в молекулі рецептору. Було доведено, що відносно невеликі

зміни – поворот на 4° двох агоніст-зв'язуючих субодиниць, – призводять до значного зміщення сегментів M2 і відкриття пори іонного каналу, що є умовою виникнення катіонного току через рецептор (Рис. 1.5). С-петля переміщується на значну відстань ($\sim 11 \text{ \AA}$) по відношенню до центру рецептора, дозволяючи Цис-Цис парі взаємодіяти з лігандом [5], [22]. Коли всі сайти зв'язування виявляються зайнятими лігандами, у рецепторі формується ротаційний момент завдяки двом процесам [5]. Спочатку відбувається зміщення петлі $\beta 1$ - $\beta 2$ відносно M2 домену. У той самий час $\beta 10$ -складка рухається проти годинникової стрілки, внаслідок чого утворюється іонний зв'язок між Арг209 та Глу45, який розташований у $\beta 1$. Зв'язок, що утворився, призводить до повороту M4 домену на 15° . При цьому гідрофобні амінокислотні залишки Вал255, Вал259 та Лей251 зміщуються, натомість полярні амінокислотні залишки Сер248 та Сер252 розвертаються у порожнину каналу. Така «заміна» амінокислотних залишків призводить до того, що канал стає гідрофільним і може пропускати відповідні катіони [8]. Такий ротаційний рух відбувається у кожній з п'яти субодиниць рецептора.

Іонна пора, утворена ділянкою M2, має вирішальне значення для селективності і провідності каналу. Амінокислотні залишки внутрішнього устя каналу є сильно електронегативними, що забезпечує у ньому стабілізацію саме катіонів. У відкритому стані канал проникний для одно- та двовалентних іонів (K^+ , Na^+ , Ca^{2+}) (Рис. 1.5). Різні субтипи рецептора, в залежності від комбінацій субодиниць, які його утворюють, є переважно проникними для різних іонів: наприклад, $\alpha 7$ nAHP більш проникний для Ca^{2+} , а nAHP скелетно-м'язового типу ($(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$) – для K^+ , Na^+ . Канал залишається відкритим протягом мілісекунд, потім рецептор переходить в десенситизований стан, нечутливий до дії агоністів. Загалом nAHP має чотири конформаційні стани: неактивний – канал закритий, середня афінність до агоністів; активований – канал відкритий, низька афінність до агоністів і два десенситизованих – канал закритий, висока афінність до агоністів, які не здатні відкрити канал.

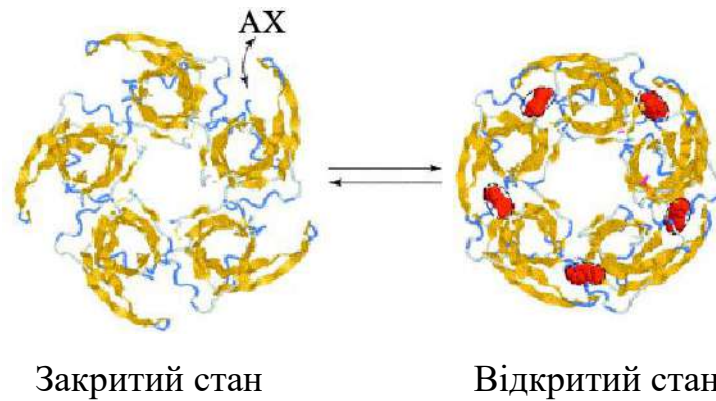


Рис. 1.5. Гіпотетичний механізм алостеричного переходу в молекулі nAChR при активації. Червоним кольором показано молекулу агоністу, зв'язаного з рецептором. АХ – ацетилхолін. [23].

Нещодавні дослідження показують, що сигналювання nAChR має дуальну природу: після зв'язування з лігандом nAChR можуть не тільки активувати іонотропний сигнальний шлях (відкривати канал для проникнення іонів Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у клітину), а й метаботропний. Як метаботропний рецептор, $\alpha 7$ nAChR опосередковує внутрішньоклітинні сигнали шляхом зв'язування $G\alpha$ і $G\beta\gamma$ білків, які в свою чергу запускають каскад реакцій через активацію фосфоліпази C [24], [25]. У деяких імунних клітинах $\alpha 7$ nAChR активує шлях сигналювання JAK2/STAT3, що призводить до інгібування транслокації ядерного фактору NF- κB до ядра – як наслідок, пригнічується синтез та вивільнення прозапальних цитокінів. Також було показано, що $\alpha 7$ активує шлях PI3K/Akt, що сприяє транслокації фактору Nrf-2 до ядра та надмірній експресії гем-оксигенази-1 (HO-1), що призводить до сильних протизапальних ефектів [26], [27], [28] (Рис. 1.6).

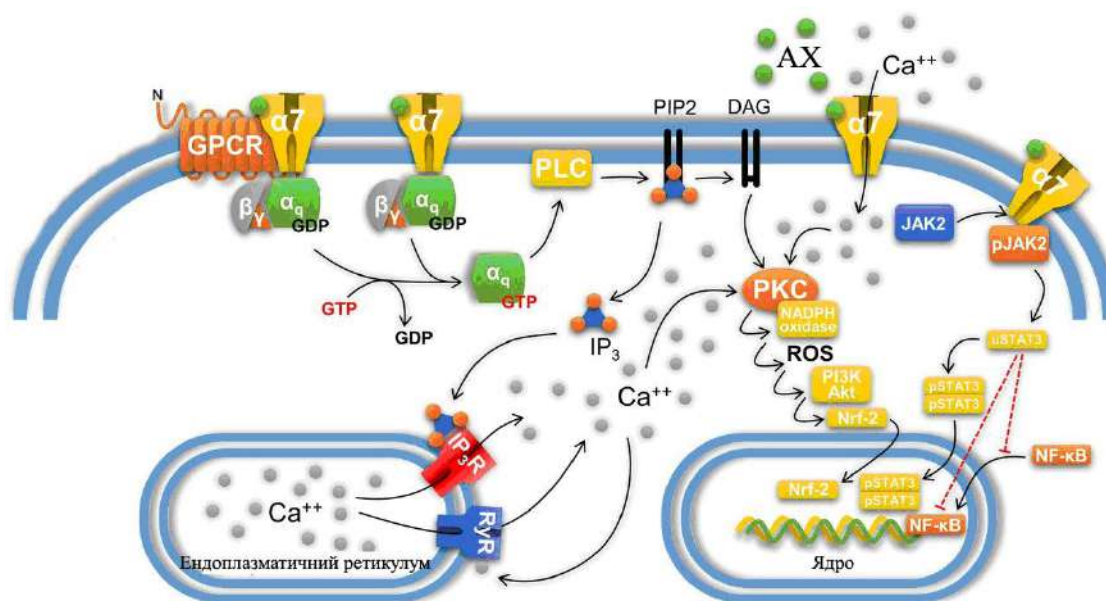


Рис. 1.6. Механізми сигналювання nAChR у клітині [21].

Кожна субодинаця nAChR є продуктом окремого гена (Табл. 1.1), який обов'язково також містить сигнальну послідовність. Як тільки сигнальна послідовність була синтезована, субодинаця переміщується до ендоплазматичного ретикулу (ЕПР). Перші посттрансляційні модифікації nAChR відбуваються у люмені ЕПР: окремо синтезовані субодинаці nAChR глікозилуються та збираються у пентамерний рецептор. Відомо, що на цьому етапі нікотин сприяє збиранню рецептора [29]. Наступним етапом синтезу nAChR є переміщення його до апарату Гольджі, де відбуваються наступні процеси приєднання вуглеводних залишків.

Збирання такого складного протеїну, як nAChR, є повільним і малопродуктивним процесом - тільки 20% з новосинтезованих субодинаць формують функціональні рецептори на поверхні клітини. Встановлено, що для синтезу та вбудовування у мембрану нового nAChR необхідно від 2 до 4 годин [30]. На всіх етапах біосинтезу nAChR може відбуватися регуляція кількісного та якісного складу рецепторів у клітині. Зокрема, в різних тканинах організму синтезуються різні субтипи nAChR. nAChR нейронального типу експресуються у печінці, де можуть бути залучені до розвитку фіброзу печінки [31], [32].

Таблиця.1.1.

Гени, які кодують субодиниці nAХР у людини

Субодиниці	Розташування на хромосомах	Назва гену	Література
Субодиниці nAХР м'язового типу			
$\alpha 1$	2q24-q32	CHRNA1	[33]
$\beta 1$	17p12-p11	CHRNB	[33]
γ	2q33-q34	CHRNA	[33]
δ	2q33-q34	CHRND	[33]
ϵ	17p13-p12	CHRNE	[33]
Субодиниці nAХР нейронального типу			
$\alpha 2$	8p21	CHRNA2	[33]
$\alpha 3$	15q24	CHRNA3	[33]
$\alpha 4$	20q13.2-q13.3	CHRNA4	[33]
$\alpha 5$	15q24	CHRNA5	[33]
$\alpha 6$	8p11.21	CHRNA6	[34]
$\alpha 7$	15q14	CHRNA7	[33]
$\alpha 9$	4p14	CHRNA9	[35]
$\alpha 10$	11q15.5	CHRNA10	[33]
$\beta 2$	1p21	CHRNB2	[33]
$\beta 3$	8p11.2	CHRNB3	[33]
$\beta 4$	15q24	CHRNB4	[33]

В процесі біосинтезу рецептора є декілька контрольних точок для того, щоб впевнитися, що тільки правильно зібраний рецептор експонується на поверхню клітини [36]. Однією з перших контрольних точок регуляції синтезу

нАХР, специфічного для певної тканини, є контроль експресії субодиниць під час транскрипції.

Посттрансляційні модифікації, що контролюють локалізацію зрілого нАХР та його експозицію на поверхні клітини, представляють особливу важливість для регуляції функції рецептора. Під час біосинтезу нАХР зазнають наступних модифікацій:

1) Утворення дисульфідних зв'язків. Як уже згадувалося вище, формування Цис-петлі може бути ключовим етапом у синтезі нАХР. Крім того, між δ -субодиницями нАХР може утворюватися ще один дисульфідний зв'язок, утворюючи димер.

2) Ацилювання. *Olson et al.* (1984) встановили, що до α - та β -субодиниць нАХР можуть ковалентно приєднуватися жирні кислоти [37]. При додаванні інгібіторів синтезу жирних кислот спостерігалось зниження концентрації рецептора на поверхні клітини майже вдвічі. Можливо, ацилювання може впливати на збирання рецептора, його внутрішньоклітинний транспорт та вбудовування у мембрану.

3) Метилування. У 1980-тих роках було встановлено, що субодиниці нАХР *Torpedo* метилуються за участю ензиму карбоксиметилази [38]. Відомо, що метилування змінює заряд та конформацію рецептора, тому фізіологічне значення такої посттрансляційної модифікації залишається невідомим.

4) Фосфорилювання. Ізольовані з *Torpedo* нАХР містять близько 9 фосфорилюваних амінокислотних залишків [39]. Фосфорилювання може відігравати роль у процесах десенситизації рецептора.

5) Глікозилювання. Дослідження вказують на те, що глікозилювання не є необхідним для асоціації субодиниць, збірки рецептора, асоціації з калнексином, формування та функціонування Цис-петлі. Проте, як тільки рецептор покидає ендоплазматичний ретикулум, правильне глікозилювання є необхідним для вбудовування рецептора у плазматичну мембрану [40].

Деградація протеїнів так само може бути ключовою точкою у питанні регуляції збірки рецептора. Фактично, 80% синтезованих субодиниць або

неправильно збираються, або деградують. Лише до 20-30% всіх новосинтезованих рецепторів вбудовуються у плазматичну мембрану [41].

1.1.2. Ліганди nAХР

nAХР здатний взаємодіяти із досить широким спектром агоністів, антагоністів, сайти зв'язування яких також знаходяться в позаклітинному домені. nAХР має також сайти зв'язування для численних лігандів, які змінюють стан рецептора через алостеричні механізми [23], [42].

Методом високороздільної електронної мікроскопії, що була проведена групою *Unwin*, та методом рентгенівських досліджень кристалізованого nAХР з молюсків було встановлено сайти та механізми зв'язування ліганду з рецептором. Сайт, що зв'язує агоніст, за своєю будовою є гідрофобною кишенею, утвореною на межі сусідніх субодиниць. У всіх випадках, "передня" або "позитивна" сторона сайту зв'язування утворюється α субодиницею ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 7$ або $\alpha 9$) за участі пари Цис-Цис. Крім пари Цис-Цис, для формування зв'язку з лігандом необхідні переважно гідрофобні ароматичні амінокислоти, зокрема α Тир93, α Тпф149, α Тир190 і α Тир198. Слід зазначити, що $\alpha 5$ і $\alpha 10$ субодиниці не зв'язують агоністів, незважаючи на те, що вони є α -субодиницями [5]. Нездатність $\alpha 5$ -субодиниці зв'язувати агоністи нікотинового рецептора пов'язана із заміщенням Тир198 на залишок Асп [43].

«Задня» або «негативна» сторона агоніст-зв'язуючого сайту складається щонайменше з трьох залишків амінокислот, кожної з $\alpha 10$, $\beta 2$, $\beta 4$, δ , γ або ϵ субодиниць. На "негативній" стороні агоніст-зв'язуючого сайту залишки Лей112, Мет114 і Трп53 сприяють зв'язуванню лігандів [5].

Загалом, наявність гідрофобних залишків на «позитивній» стороні сайту зв'язування визначає спорідненість рецептора до лігандів, тоді як залишки «негативної» сторони визначають селективність даного сайту відносно лігандів. Аналіз структури nAХР також показує, що після зв'язування ліганд опиняється

у «кишені», де він практично повністю оточений білковою структурою субодиниці рецептора [44].

До лігандів nAChR відносяться агоністи, антагоністи, алостеричні модулятори. Агоністи та антагоністи можуть бути конкурентними (якщо зв'язуються з ортостеричним сайтом зв'язування ацетилхоліну) та неконкурентними (якщо зв'язуються у відмінному від ортостеричного сайту місці). Алостеричні модулятори, зв'язуючись з рецептором у відмінному від ортостеричного сайті (здебільшого у трансмембранному домені), самі по собі не відкривають канал, але посилюють (позитивні алостеричні модулятори, positive allosteric modulators, ПАМи) або послаблюють (негативні алостеричні модулятори, negative allosteric modulators, НАМи) дію ортостеричних агоністів.

Субтипи nAChR відрізняються за афінністю до різних агоністів, що визначається амінокислотним складом компонентів ліганд-зв'язуючого центру. Так, наприклад, $\alpha 4\beta 2$ nAChR зв'язує епібатидин із більшою афінністю, ніж цитизин, а цитизин - більше, ніж нікотин, при цьому, $\alpha 4\beta 4$ nAChR, навпаки, більш чутливий до нікотину, ніж до цитизину [45].

Лігандами nAChR можуть бути речовини, які синтезуються в організмі (ацетилхолін, холін), природні речовини (наприклад, нікотин, епібатидин, цитизин, токсини змій і моллюсків, коронаридин) та хімічно синтезовані речовини (наприклад, PNU282987, PNU-120596, PAM2, TQS).

Ацетилхолін - ендогенний агоніст, який зв'язується з усіма субтипами nAChR ($EC_{50} \sim 50$ мкМ). Швидко деградує під дією ацетилхолінестерази. Холін, який утворюється у результаті гідролізу, є агоністом $\alpha 7$ nAChR ($EC_{50} = 1,6-3,1$ мМ) та слабким агоністом $\alpha 3\beta 4$ nAChR.

Нікотин – це рослинний алкалоїд із тютюну, зв'язування якого визначає приналежність АХР до нікотинового, а не мускаринового типу. Нікотин зв'язується з усіма субтипами nAChR, близько до сайту зв'язування ацетилхоліну. Нікотин здатен активувати нейрональні субтипи nAChR у мікромолярних концентраціях [46].

Ще один природній агоніст nAХР – епібатидин, речовина, що продукується шкірою еквадорської отруйної жаби; він відкритий порівняно нещодавно і є більш потужним агоністом, ніж нікотин для деяких субтипів nAХР [47].

Крім того, існує чимало штучно синтезованих агоністів nAХР, які використовують у клінічних і наукових дослідженнях. Наприклад, PNU-282987 ($EC_{50} = 150$ нМ), високо селективний агоніст $\alpha 7$ nAХР. АВТ-418, синтезований Abbott Laboratories, є аналогом нікотину, в якому 3-метилізоксазол заміщує один із компонентів піримідинового кільця. АВТ-418 проявляє високу спорідненість до $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 2\beta 2$ та $\alpha 7$, проте не до $\alpha 3\beta 4$ nAХР [48]. Інший агоніст, АВТ-594, проявляє високу спорідненість до $\alpha 4\beta 2$ nAХР, а АВТ-107 – до $\alpha 7$ nAХР[49].

Пептидні токсини, що були виявлені у змії і моллюсків, низькомолекулярна речовина метиллікаконітин (МЛІА) та сполука дигідро- β -еритроїдин є конкурентними антагоністами nAХР. Після зв'язування з рецептором конкурентні антагоністи не дозволяють йому зв'язуватися з природнім агоністом, оскільки утворюються зв'язок саме у сайті зв'язування ліганду, або в безпосередній близькості до нього. Саме завдяки нейротоксинам, що були виділені у 1970-х роках зі змії роду *Bungarus* і *Naja*, стало можливим виділення і дослідження функцій nAХР. Власне токсин α -бунгаротоксин було отримано з отрути змії *Bungarus multicinctus*. В останні роки виділено широкий спектр токсинів із отрути морського моллюска роду *Conus*. Ці олігопептидні нейротоксини названо конотоксинами. Вони є високо селективними до окремих субтипів nAХР [50].

Неконкурентні інгібітори, такі, як етанол, локальні анестетики і барбітурати, зв'язують два типи алостеричних сайтів і тим самим унеможливають активацію nAХР.

Особливу цікавість становлять речовини, що не контактують з сайтом зв'язування АХ, а впливають на інші ділянки рецептора, модулюючи дію nAХР. Такі речовини називають алостеричними модуляторами. Розрізняють

позитивні алостеричні модулятори, негативні алостеричні модулятори та агоніст-подібні алостеричні регулятори.

Позитивні алостеричні модулятори знижують енергетичний бар'єр переходу nAHP зі стану спокою до відкритого (активованого) стану, або підвищують бар'єр переходу від відкритого до десенситизованого. Тим самим підвищується вірогідність активації рецептора та відповідно дії агоністу. Самі по собі ПАМи не здатні ініціювати відкриття каналу. ПАМи дуже різноманітні за своєю хімічною структурою. Серед ПАМів, здатних впливати на функціонування nAHP, є штучно синтезовані хімічні сполуки (PNU120596, PAM-2, TQS), ендogenous молекули (SLURP-1), речовини, виділені з живих організмів (dFBr).

За властивостями моделювати функціонування nAHP ПАМи розділяють на ПАМ I та II типу. ПАМи I типу (напр., NS-1738, SB-206553, LY-2087101) підвищують ефективність агоністів nAHP, не впливаючи на кінетику десенситизації. На відміну, ПАМи II типу (PNU 120596, TQS, galantamine, memogain, A-867744, Atropine, PAM-2) пригнічують здатність рецептора до десенситизації, а також у декілька разів підвищують максимальну амплітуду та силу струму. 4BP-TQS відноситься до так званих агоніст-подібних ПАМів II типу (або «аго-ПАМ»): він здатний активувати nAHP подібно до агоністу, проте зв'язується у топографічно віддаленому сайті [51].

Першим ПАМом, дію якого було протестовано на тваринах, був ПАМ II типу - PNU-120596. Системне введення PNU-120596 щурам покращувало дефіцит слуху, спричинений амфетаміном, у моделі, що відображає порушення, пов'язані з шизофренією [52]. На сьогоднішній день, ПАМи розглядаються в якості перспективних терапевтичних засобів та використовуються у клінічних дослідженнях. Наприклад, ПАМ AVL-3288, специфічний до $\alpha 7$ nAHP, використовують для лікування хворих на шизофренію [53].

1.1.3. Патології нервової системи, пов'язані з функціями nAHP.

На відміну від м'язів та автономних гангліїв, де пост-синаптичні nAHR опосередковують швидку синаптичну передачу, у мозку ссавців nAHR розташовані пре- і поза-синаптично, де здебільшого модулюють активність нейронів. В центральній нервовій системі представлені гомо- та гетеромерні nAHR. Найбільше експресуються $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7\beta 2$ [54,55]. Хоча гетеромерний $\alpha 3\beta 4$ nAHR традиційно вважався рецептором, що експресується у гангліях периферичної нервової системи, була підтверджена їх наявність і у мозку – у *interpeduncular nucleus* та *medial habenula* [56], [57]. Субодиниці $\alpha 5$ та $\beta 3$ також ідентифіковано у різних регіонах мозку, але відносний їх вміст незначний [47]. nAHR у мозку відіграють важливу роль у розвитку нікотинової залежності та в когнітивних процесах, таких як пам'ять і здатність до навчання, а також – у контролі життєздатності, диференціації і міграції нейронів. Дисфункція або дефіцит нейрональних nAHR викликає ряд нейропатологій, таких як епілепсія, аутизм, шизофренія, та нейродегенеративні захворювання (хвороби Альцгеймера та Паркінсона), що супроводжуються також запаленням [58], [59].

Хвороба Альцгеймера (ХА) – нейродегенеративне захворювання, що виникає у літніх людей (у 1 з 10 старших 65 років), що перш за все характеризується втратою пам'яті, труднощами з мовою, пізнавальними навичками та повсякденною діяльністю людини. Незважаючи на великі зусилля, здійснені впродовж останніх десятиліть, досі немає загальновизнаного пояснення причин виникнення патологічних змін, що призводять до розвитку ХА. Дослідження показують, що розвитку ХА передують нейрозапалення, головну участь у якому відіграють мікроглія та астроцити мозку [60]. Головними діагностичними маркерами ХА є накопичення олігомеризованого фрагмента бета-амілоїду ($A\beta$) (т.зв. «сенільні бляшки») поза нейронами та гіперфосфорильованого білка тау всередині клітин. Бета-амілоїдні бляшки є аберантною формою протеолізу великого пептиду-попередника, який в нормі розщеплюється з утворенням секреторного пептиду. Тау також присутній у мозку здорових людей, проте його вміст у мозку хворих на ХА зростає у сотні разів [61]. Вважається, що бета-амілоїдні бляшки сприяють загибелі клітин,

заважаючи контактам нейронів між собою; тау-пучки блокують транспортування поживних речовин та інших важливих молекул всередину нейронів. На ранніх стадіях ХА спотерігається порушення холінергічної іннервації. Холінергічний дефіцит проявляється через зниження вмісту і активності холін-ацетилтрансфери і везикулярного транспортеру ацетилхоліну. Сучасна модель холінергічного дефіциту при ХА показує, що неправильно сформовані А β та тау накопичуються переважно в септо-гіпокамповому шляху, що призводить до втрати холінергічних нейронів в базальному ядрі переднього мозку через порушення функціонування nAChR та трофічної системи підтримки росту нервів [62].

Встановлено, що у мозку хворих на ХА найбільше знижується рівень $\alpha 4\beta 2$ субтипу nAChR [63]. Знайдена кореляція між зниженням кількості сайтів зв'язування епібатидину і пресинаптичного маркера синаптофізину в корі мозку хворих на ХА означає, що знижуються переважно пресинаптичні nAChR [64]. Більше того, зниження активності холін-ацетилтрансфери не корелювало із зниженням зв'язування епібатидину, тобто втрата nAChR відбувалася не тільки в холінергічних нейронах. Таким чином, функції nAChR, втрачені при ХА, стосувалися більше регуляції інших рецепторів, ніж холінергічної передачі як такої.

Було знайдено зв'язок між nAChR і накопиченням β -амілоїду. Нікотин посилював секрецію попередника β -амілоїду із клітин феохромоцитоми РС-12 [65] і захищав нейрони від токсичності β -амілоїду; цей ефект був опосередкований $\alpha 4\beta 2$ і $\alpha 7$ субтипами nAChR [66]. Пізніше було показано, що β -амілоїд прямо взаємодіє як з $\alpha 7$ підтипом nAChR [67], так і з ацетилхолінестеразою [68]. Відомо, що нікотин, агоніст nAChR, покращував розумові здібності у хворих, а паління тютюну зменшувало ризик розвитку ХА [15]. Тому деякі агоністи $\alpha 7$ nAChR та позитивні алостеричні модулятори були запропоновані в якості потенційних терапевтичних засобів, спрямованих на розлади центральної та периферичної нервової системи, що включають запалення, ХА, шизофренію, та навіть біль [69], [70]. Одну з таких сполук, S-

24795, нещодавно було безпосередньо перевірено на ефективність при ХА; додавання S-24795 до *post-mortem* препаратів мозку хворих на ХА сприяло дисоціації бета-амілоїду та $\alpha 7$ nAХР, що відновлювало функцію рецептора та його нейрозахисні властивості [71]. Таким чином, агоністи та алостеричні модулятори nAХР є потенційними терапевтичними агентами при ХА.

Хвороба Паркінсона (ХП) – це вікове нейродегенеративне захворювання, поширене серед людей віком від 55 років (1-2%) [72]. При ХП відбувається прогресуюча дегенерація допамінергічних нейронів у чорній субстанції мозку, що призводить до тремтіння, брадикінезії та деменції [73]. За сучасними уявленнями, патогенез ХП включає в себе порушення синтезу та функціонування певних протеїнів, порушення функціонування мітохондрій, оксидативний стрес та запалення [74]. Наразі лікування ХП не існує – лише полегшення симптомів. Класична терапія ХП включає штучне введення допаміну або його попередників (препарат леводопа). Багато досліджень вказують на те, що паління тютюну попереджає розвиток ХП [75], [76]. Це свідчить про непряму роль nAХР, що регулюють допамінергічну передачу. При ХП спостерігається втрата холінергічних клітин і значне зниження кількості високоафінних сайтів зв'язування нікотину в мозку [77].

Епілепсія – це група захворювань різної етіології, що вражає близько 2% загальної популяції. Накопичені дані свідчать про роль ацетилхоліну та холінергічної нейротрансмісії в розвитку епілепсії [78], [79], [80]. Дослідження великої кількості родин виявили три мутації в гені $\alpha 4$ субодиниці nAХР CHRNA4 та дві мутації в гені $\beta 2$ субодиниці nAХР CHRNB2, які відповідають за особливу форму генетично трансмісивної епілепсії - аутосомну домінантну епілепсією фронтальної долі [81], [82]. Ця хвороба проявляється у короткочасних судомах під час легкого сну (швидкий рух очей) і часто помилково діагностується як нічні жахи [83]. Одна з мутацій у CHRNA4 (мутація T265M, розташована у трансмембранному домені M2) призводить до підвищеної чутливості рецептора до ацетилхоліну та характеризується низькою проникністю іонів [84]. У пацієнтів, хворих на ювенільну міоклонічну

епілепсію, виявлено різні мутації гену, який кодує $\alpha 4$ -субодиницю (CHRNA4) [85]. У клінічних дослідженнях тестують антагоністи nAХР для лікування вище вказаних типів епілепсії (таких як карбамазепін або оксикарбазепін) [86], [87].

Шизофренія – це складне комплексне захворювання, що проявляється такими симптомами, як галюцинації, марення, розладами мислення, уникненням людей, манією переслідування, апатією та когнітивним дефіцитом (порушенням уваги, пам'яті) [88]. Раніше вважалося, що основною причиною виникнення шизофренії є надлишок допаміну, а також певна, але не до кінця з'ясована генетична спадковість. Проте епідеміологічні дослідження показують, що приблизно 70–90 % хворих на шизофренію є активними курцями, порівняно з 25 % курців серед всього населення [89]. Крім того, пацієнти з шизофренією вживають більше цигарок щодня, глибше вдихають, палячи цигарку, а також вибирають цигарки з більшим вмістом нікотину [90]. Ці дані можуть свідчити про те, що паління є формою самолікування для полегшення симптомів шизофренії, і вказують на залучення nAХР до патології цього захворювання. Під час дослідження мозку хворих на шизофренію *post mortem* (зокрема у гіпокампі, ретикулярному ядрі таламуса та корі) було виявлено знижену кількість сайтів зв'язування цитизину і α -БГТ [91], а також знижену експресію $\alpha 7$ nAХР [92]. Натомість, в крові хворих на шизофренію було знайдено антитіла проти nAХР, що може бути фактором зниження рівней nAХР на клітинах [93]. Отже, паління цигарок компенсує дефіцит нікотинової нейропередачі. Також варто зазначити, що шизофренія супроводжується загальними запальними процесами у центральній нервовій системі, про що свідчить той факт, що у хворих на шизофренію у крові та спинально-мозковій рідині спостерігається високий вміст про-запальних цитокінів [94].

Синдром Туретта (СТ) – це розлад централь, що вперше проявляється у людей, молодших за 18 років, та характеризується раптовими, короткими та швидкими, моторними і вокальними судомами, а також широким спектром інших поведінкових проблем, включаючи нав'язливі ідеї, тривожність, імпульсивність та гіперактивність. Терапевтичне лікування полягає у

використанні антагоністів допамінових рецепторів - галоперидолу, пімозиду, сульпіриду [95]. Було показано, що нікотинова жувальна гумка значно знижувала судоми та покращувала концентрацію та увагу хворих на СТ, які отримували галоперидол. Однак сам по собі нікотин мав незначний вплив на стан хворих [96], [97]. Було відзначено, що використання нікотинового пластиру при СТ більш ефективно, ніж нікотинова гумка, за рахунок більш тривалого ефекту [98]. Ці спостереження призвели до гіпотези про те, що в основі позитивного впливу нікотину на стан хворих на СТ лежить десенсibiliзація nAHP. Десенсibiliзовані nAHP перестають виконувати свої функції на допамінових терміналях у стріатумі, що призводить до зниження вивільнення допаміну та обмеження активності доамінергічних нервових шляхів [99].

Один із найбільш важливих відкриттів у нейропсихіатрії є те, що депресивні стани пов'язані з дисфункцією нейроендокринної системи у результаті довготривалого стресу, який супроводжується запаленням периферичної та центральної нервової системи, пошкодженням нервових клітин та зниженням нейрогенезу у гіпокампі [100]. Ацетилхолін відіграє важливу роль у регуляції нейроендокринної системи у відповідь на емоційний та фізіологічний стрес. Ацетилхолін полегшує вивільнення стрес-чутливих нейрогормонів та пептидів, в тому числі кортикостерону, адренкортикотропного гормону, кортикотропін-вивільнюючого фактору [101]. Відомо, що хворі на депресію на 50–60% частіше палять цигарки, порівняно з здоровими людьми [102], а в деяких індивідів відмова від паління супроводжується симптомами манії та депресії [103]. Анти-тривожний ефект нікотину обумовлений активацією рецепторів ГАМК, тобто у даному випадку nAHP регулюють вивільнення інгібіторного медіатора ГАМК [104].

Проте традиційно функціональні nAHP були віднесені виключно до клітинної плазматичної мембрани, а їх внутрішньоклітинний «пул» розглядався в якості новосинтезованих попередників на шляху до поверхні мембрани. У

лабораторії імунології клітинних рецепторів вперше було виявлено локалізацію функціонально активних НАХР на зовнішній мембрані мітохондрій.

1.2. Мітохондрії

1.2.1. Будова мітохондрій

Вперше мітохондрії були описані R. Altman [105] (1890) та названі C. Benda [106] (1898) – з грец. "mitos" (нитка) та "chondros" (гранули), маючи на увазі появу цих структур під час сперматогенезу. Перша високо-роздільна електронна мікрофотографія була опублікована G.Palade у 1952 році [107]. Загальноприйнятою вважається ендосимбіотична теорія походження мітохондрій, відповідно до якої мітохондрії – це протеобактерії (архе-бактерії), які 1,5-2 млрд. років тому були поглинуті сучасними еукаріотами та вступили з ними у симбіоз [108].

Мітохондрії присутні у еукаріотичних організмах (у тому числі і в рослинах), де відіграють ряд критичних функцій: продукування енергії, синтез АТФ, депо Ca^{2+} , продукування активних форм кисню, участь у рості та загибелі клітини [109]. Нещодавно було виявлено, що мікроорганізм оксимонада *Monocercomonoides sp.* – єдиний відомий еукаріотичний організм, який не має мітохондрій [110].

Мітохондрії оточені двома мембранами, внутрішньою та зовнішньою, які відділяють внутрішнє мітохондрійне середовище (матрикс) від цитозолю. Внутрішня мембрана формує численну кількість складок, які називають кристами (Рис. 1.7). За ліпідним та складом протеїнів зовнішня та внутрішня мембрани відрізняються [111]. Внутрішня мітохондрійна мембрана характеризується високим вмістом кардіоліпіну, низьким вмістом тригліцеридів, а також наявністю протеїнів дихального ланцюга. Загальний вміст ліпідів, фосфатидилхоліну, фосфотидилінозитулу, плазмалогену та тригліцеридів є вищим у зовнішній мітохондрійній мембрані [112].

Внутрішня мембрана є непроникною для більшості іонів та малих молекул – критична властивість для підтримання протонного градієнту, що є необхідним для окисного фосфорилування. Напротивагу, зовнішня мембрана завдяки білкам поринам є проникною для малих молекул вагою до 6 кДа. Склад міжмембранного простору є подібним до цитозолю.



Рис. 1.7. Мікрофотографія мітохондрій інфузорії (*Paramecium multimicronucleatum*). Збільшення $\times 22,500$. Масштаб = 0.5нм. Фото [113].

У матриксі мітохондрій локалізований генетичний апарат, а також ферменти, які залучені до оксидативного метаболізму, циклу лимонної кислоти, обміну жирних кислот.

Двониткова кільцева ДНК мітохондрій людини містить лише 37 генів: 13 генів протеїнів дихального ланцюга (з 90 білків, які входять до його складу), 22 гени транспортних РНК та 2 гени рибосомних РНК (12S and 16S). Всі інші протеїни, необхідні для функціонування мітохондрій, імпортуються з цитозолю. Мітохондрійна ДНК легко піддається мутаціям, оскільки в мітохондріях відсутній механізм репарації [114].

Кількість, розмір та форма мітохондрій варіює у різних типах клітин та тканин. Складність визначити розмір мітохондрій (від 0,5 до 10 мкм) пов'язана

з тим, що мітохондрії у клітині можуть утворювати мережу, яка отримала назву мітохондріон. При цьому на електронних знімках мітохондріон може виглядати як декілька окремих мітохондрій.

Мітохондрії можуть зливатися (fusion) та ділитися (fission) [115]. Мітохондрії зливаються в процесі, який вимагає участі ГТФаз, що локалізовані на внутрішній та зовнішній мітохондрійних мембранах [116]. Протеїни, що відповідають за злиття мітохондрій, мають назву Optic atrophy 1 (OPA1) і Mitofusins 1 та 2 (MFN1 та MFN2) [117]. У процес поділу мітохондрій залучені ряд протеїнів, серед яких найбільш дослідженим є GTPase Dynamin related protein 1 (DRP1). Рух мітохондрій у перинуклеарному просторі клітини ~ 0.1 - $0,2$ мкм/секунду, а у цитозолі – $\sim 0,7$ мкм/секунду [118], та регулюється іонами Ca^{2+} [119]. Ряд білків (KIF5, Milton, Miro, Myosins) зв'язують зовнішню мембрану мітохондрії з мікротрубочками, вздовж яких відбувається рух мітохондрій [120].

1.2.2. Мітохондрії і апоптоз

Термін "апоптоз" (від грец. «apoptosis» – процес опадання листя з дерева) вперше був використаний в 1972 році для опису морфологічно виразної форми загибелі клітин [121]. Найбільше процес апоптозу досліджений у нематоди *Caenorhabditis elegans* [122]. В організмі нематоди утворюється 1090 соматичних клітин, з яких 131 елімінуються у процесі апоптозу – «запрограмованої клітинної загибелі».

Апоптоз вважається важливим процесом, необхідним для функціонування організму, у тому числі забезпечення нормального життєвого циклу клітин, оновлення тканин організму, розвитку та функціонування імунної системи, ембріонального розвитку. Напротивагу, порушення процесу апоптозу є фактором багатьох хвороб людини, включаючи нейродегенеративні захворювання, ішемічні ушкодження, аутоімунні розлади та різні типи раку.

Запрограмована клітинна загибель може бути викликана як зовнішніми (токсини, гіпоксія, гіпертермія, вірусні інфекції, вільні радикали тощо), так і внутрішніми факторами (наприклад, відсутність певних ростових факторів, гормонів, цитокінів). Наприклад, радіація або ліки, що використовують при лікуванні раку хемотерапією, викликають пошкодження ДНК, що запускає апоптоз по *p53*-залежному шляху [123]. Деякі гормони, такі як кортикостероїди, можуть викликати апоптоз лише певних клітин (наприклад, тимоцитів), не впливаючи на інші клітини організму [124].

Апоптоз може відбуватися за різними механізмами: зовнішнім та внутрішнім. Зовнішній шлях активується рецепторами родини фактора некрозу пухлин (TNF) [125], а у внутрішньому шляху головну роль відіграють мітохондрії.

В основі розвитку апоптозу за мітохондрійним типом лежить активація мітохондрійної пори перехідної проникності (mitochondria permeability transition pore, mPTP) та утворення в зовнішній мембрані мітохондрій мітохондрійного апоптоз-індукованого каналу (mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC) [126].

Початковим кроком індукції загибелі клітини за мітохондрійним шляхом є відкриття мітохондрійної пори перехідної проникності [127]. Активаторами та індукторами mPTP виступають висока концентрація Ca^{2+} в мітохондрійному матриксі, неорганічний фосфат, лужне рН, фенилазин оксид, діамід, атрактилозид, мастопаран та активні форми кисню [128], [129]. Іони Mg^{2+} , низьке рН, циклоспорин А та інгібітори фосфоліпаз запобігають відкриттю mPTP [130].

Мітохондрійна пора перехідної проникності (mPTP) – це складний комплекс протеїнів у внутрішній та зовнішній мембранах мітохондрій, які разом утворюють велику пору. Внаслідок відкриття mPTP відбувається деполяризація мітохондрійної мембрани, набряк мітохондрії та вивільнення білків (так званих, про-апоптотичних) до цитозолу. Відомо, що через пору

виходять лише молекули до 1500 Да; вивільнення протеїнів відбувається через MAC.

Не зважаючи на більш як 20-річне дослідження процесу апоптозу та утворення mPTP, сам механізм формування пори залишається мало зрозумілим [131], [132], [133]. Раніше вважалося, що до складу mPTP входять протеїни циклофілін D, потенціал-залежний аніонний канал (voltage-dependent anion channel VDAC) та транслоказа аденінового нуклеотиду (adenine nucleotide translocase, ANT). Проте на різних моделях нокаутних мишей було показано, що відсутність різних ізоформ як VDAC, так і ANT, не призводила до радикальних порушень утворення mPTP [134], [135]. Ці дані сприяли перегляду уявлень про будову mPTP. За одними уявленнями mPTP складається з білків Вах та Вак у зовнішній мембрані мітохондрій, ANT, АТФ-синтази та білку-переносника фосфатів у внутрішній мембрані мітохондрій та циклофілін D у матриксі [136]. За іншою запропонованою моделлю mPTP є комплексом білків, серед яких білки SPG7 та AFG3L2 знаходяться у внутрішній мембрані, а VDAC – у зовнішній мембрані мітохондрій [133], [137].

Потенціал-залежний аніонний канал (VDAC) – це висококонсервативний протеїни з 280 амінокислотних залишків (>30 kDa). VDAC є гомологічним бактеріальному білку-каналу порину: складається з 19 β -складок, які формують β -бочку. Висота та ширина β -бочки 35Å та 40Å відповідно. При відкритті каналу утворюється пора діаметром 2,6 – 3 нм, через яку проходять водорозчинні молекули з молекулярною масою до 5 кДа [138]: АТФ, АДФ, P_i , Ca^{2+} , K^+ та Na^+ . В закритому стані (діаметр 1,8 нм) VDAC проникний для невеликих катіонів. VDAC може утворювати олігомери [139]. У хребетних експресується три ізоформи: VDAC1, VDAC2, VDAC3. Різні внутрішньо- та зовнішньо-клітинні фактори можуть регулювати VDAC. Фосфорилування VDAC (наприклад, JNK3, протеїнкіназою А, Ser-Thr кіназами GSK3 β) викликає закриття каналу та подальшу загибель клітини [140].

На першому етапі мітохондрійного шляху апоптозу вивільнюються цитохром С (Цит С), Smac/DIABLO, Apoptosis Inducing Factor (AIF) та серинова

протеаза HtrA2/Omi [141], [142]. Ці протеїни активують апоптотичний шлях, залежний від каспаз: Цит С зв'язується і активує Araf-1 та procaspase-9, утворюючи «апоптосому» [143]. Зв'язування procaspase-9 активує caspase-9, яка в свою чергу активує caspase-3/7 [144]. Важливим регулятором функціонування каспаз є протеїн Bid [145]. DIABLO (diablo IAP-binding mitochondrial protein; також відомий як second mitochondrial activator of caspases, SMAC) та HtrA2/Omi викликають апоптоз шляхом пригнічення активності інгібіторів апоптотичних протеїнів [142].

Вивільнення мітохондрійного Цит С до цитозолу є одним із ключових елементів у процесі апоптозу. Цит С, глобулярний білок з молекулярною вагою 12,5 кДа з дев'ятьма позитивними залишками при нейтральному рН, входить до складу дихального ланцюга, що може пояснити зв'язок біоенергетичного обміну та апоптозу. Встановлено, що вивільнення мітохондрійного Цит С може індукуватися різними чинниками: активація Fas і TNF, дефіцит ростових факторів, надмірне пошкодження ДНК, лікування хіміотерапевтичними лікарськими засобами тощо.

Контроль та регуляція мітохондрійного шляху апоптозу відбувається за участю протеїнів родини Bcl-2 [146], [142]. Протеїни родини Bcl-2 локалізовані на зовнішній мембрані мітохондрій, де вони структурно зв'язані з проапоптичними білками Bax та Bad. Частина з них транслокується до мітохондрій за дії апоптогенних чинників. Протеїни родини Bcl-2 регулюють формування мітохондрійного каналу, індукованого апоптозом (MAC), що є одним із критичних етапів раннього апоптозу. MAC був вперше ідентифікований методом петч-клемп у зовнішній мембрані мітохондрій апоптотичних клітин [147]. Розмір утвореної пори достатньо великий для проходження великих молекул, наприклад 17 кДа декстрину або 12,5 кДа Цит С [148]. Надмірна експресія Bcl2 або Bcl-xL блокує вивільнення Цит С та зупиняє процес апоптозу [149]. У той самий час надмірна експресія Bax, проапоптотичного білка, сприяє вивільненню Цит С [150].

На пізніших стадіях апоптозу, коли клітина вже фактично «вирішує» померати, з мітохондрій вивільнюються про-апоптотичні білки, ендонуклеаза G та CAD. Ці білки транспортуються до ядра та викликають фрагментацію ДНК (фрагменти ~50–300 т.п.н.) та конденсацію периферичного ядерного хроматину [151].

1.2.3 nAChR в мітохондріях

Вперше у 1984 році *R. Lukas* показав, що ^{125}I - α -бунгаротоксин зв'язується з мітохондріями мозку щурів [152]. Це стало приводом розглянути можливість наявності nAChR у мітохондріях. *Kyriatsoulis et al.* також показали, що антитіла у пацієнтів з біліарним цирозом розпізнають подібні антигени у мітохондріях печінки та мембранах, в яких є підвищений вміст nAChR [153]. Пізніше за допомогою методу фарбування гістологічних зрізів імунозолотом було виявлено, що $\alpha 7$ -специфічних антитіла зв'язуються з мітохондріями, проте оскільки ці дані не підтвердилися на Вестерн-блоті, автори не ризикнули стверджувати, що nAChR можуть бути присутніми у мітохондріях [154].

З іншого боку, велика кількість досліджень свідчила про те, що нікотин має нейропротекторний ефект, впливає на шляхи апоптозу, на фосфорилування анти-апоптотичного білка Bad, на транслокацію білка Bax, а також вивільнення Цит С з мітохондрій [155], [156], [157], [158]. Більшість цих ефектів пов'язували із безпосереднім рецептор-незалежним впливом нікотину на мітохондрійну пору перехідної провідності та дихальний ланцюг мітохондрій. Проте *Li et al.* показали, що вплив нікотину на вивільнення Цит С з мітохондрій за дії етанолу послаблюється у присутності МЛА, тобто може бути опосередкований $\alpha 7$ nAChR [155].

В лабораторії імунології клітинних рецепторів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України було вперше доказано присутність nAChR на мітохондріях. Спочатку, зважаючи на вірогідно прокаріотичне походження мітохондрій, акцент було зроблено на $\alpha 7$ nAChR, який є одним із найбільш

еволюційно древніх типів цього рецептора. Було показано зв'язування антитіл проти $\alpha 7$ nAХР з мітохондріями клітин гліобластоми U373, які визначались антитілами проти транслокази зовнішньої мембрани мітохондрій TOM22 або Mitotracker GREEN, специфічним для ліпідів зовнішньої мембрани [159]. Методом електронної мікроскопії було показано зв'язування мічених колоїдним золотом $\alpha 7$ -специфічних антитіл на мітохондріях, виділених з печінки мишей. Сендвіч-імуноферментним методом, розробленим у лабораторії імунології клітинних рецепторів, було показано, що антитіла, специфічні до $\alpha 7$ субодиниці nAХР, зв'язуються з зовнішньою мембраною мітохондрій, виділених з печінки мишей дикого типу, але не з печінки мишей, нокаутних за геном $\alpha 7$ nAХР [3]. Ці дані продемонстрували наявність $\alpha 7$ nAХР на зовнішній мембрані мітохондрій.

Для з'ясування функцій nAХР в мітохондріях спочатку вивчали їх зв'язок із мембранним потенціалом мітохондрій та їх здатністю накопичувати Ca^{2+} . Було встановлено, що мітохондрії мишей, які хронічно отримували нікотин з питною водою, мали нижчий рівень базового мембранного потенціалу порівняно з мітохондріями контрольних мишей. Попередня інкубація ізольованих мітохондрій з нікотинном запобігала дисипації їх мембранного потенціалу при додаванні Ca^{2+} , і цей ефект підсилювався MLA. Більше того, мітохондрії мишей, яким внутрішньовенно вводили $\alpha 7$ -специфічні антитіла, мали знижений мембранний потенціал, який не зменшувався при додаванні Ca^{2+} . Агоністи $\alpha 7$ nAХР (холін, АХ або PNU-282987) запобігали накопиченню Ca^{2+} у мітохондріях подібно до DIDS (4,4'-дизотіоціано-2,2'-стилбену дисульфокислота) - інгібітора потенціал-залежного аніонного каналу (VDAC). VDAC є одним з основних компонентів зовнішньої мембрани мітохондрій і компонентом каналу, який утворюється при дії апоптогенних чинників для вивільнення факторів, що ініціюють апоптоз, напр. Цит С [160]. Було показано безпосередній зв'язок $\alpha 7$ nAХР з VDAC у зовнішній мембрані мітохондрій, що свідчило про можливу участь nAХР в регуляції мітохондрійного шляху

апоптозу. Дійсно, наступні експерименти показали, що агоністи $\alpha 7$ nAХР (холін, АХ або PNU-282987) попереджали вивільнення Цит С із ізольованих мітохондрій, стимульоване дією Ca^{2+} (9-90 мкМ) або H_2O_2 (0,5 мМ) [4].

Подальші експерименти показали, що у мітохондріях присутній не лише $\alpha 7$ субтип nAХР. Методом Сендвіч-імуноферментного аналізу, в якому використовуються антитіла проти різних субодиниць nAХР, було встановлено, що в мітохондріях також наявні $\alpha 3$, $\alpha 4$ та $\beta 2$ субодиниці. Більш того, $\alpha 7$ субодиниця nAХР експресується у мітохондрії у складі гетеромерного рецептора $\alpha 7\beta 2$. При цьому спектр субтипів nAХР є тканино-специфічним: у мітохондріях печінки більше $\alpha 7$ субодиниць і менше $\alpha 3$ та $\alpha 4$, в мітохондріях мозку – більше $\alpha 4$ -вмісних, а в мітохондріях легень – більша частка саме $\alpha 3$ - та $\alpha 4$ -вмісних nAХР [161]. S. Grando et al. показали, що $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 2$ та $\beta 4$ субодиниці nAХР наявні в мітохондріях, виділених з кератиноцитів [162].

Механізм сигналювання мітохондрійних nAХР, вочевидь, відрізняється від такого у збудливих клітинах і є іон-незалежним. Було показано що вивільнення Цит С із ізольованих мітохондрій, викликане дією апоптогенних чинників, знижується під дією не тільки агоністів nAХР, але й за дії конкурентних антагоністів, таких як MLA (50 нМ, для $\alpha 7$ nAХР), конотоксин МІІ (1 нМ, для $\alpha 3\beta 2$ nAХР), дигідро- β -еритроїдин (Dh β E, 1 мкМ, для $\alpha 4\beta 2$ nAХР), та навіть $\alpha 7$ nAХР-специфічних антитіл [4]. Із застосуванням інгібіторів різних кіназ було з'ясовано, що до сигналювання nAХР залучені внутрішньомітохондрійні кінази. Було показано, що вивільнення Цит С під дією Ca^{2+} або H_2O_2 ініціюється різними сигнальними шляхами: Ca^{2+} активує СаКМІІ та протеїнкіназу С, а H_2O_2 – Src – кіназу та протеїнкіназу С. Додавання інгібіторів цих кіназ призводило до зниження вивільнення Цит С; аналогічний ефект спостерігався при дії nAХР-специфічних лігандів, причому ліганди різних субтипів nAХР впливали вибірково на вивільнення Цит С за дії Ca^{2+} або H_2O_2 . Активація P1_3 -кінази, навпаки, є необхідною для підтримки цілісності мітохондрій, і її інгібування стимулює вивільнення Цит С з мітохондрій

подібно до Ca^{2+} або H_2O_2 . $\alpha 7$ -специфічний агоніст PNU-282987 блокував ефект інгібітора PI_3 -кінази, вортманіну, та відновлював рівень фосфорилування Akt-кінази (що відбувається після активації PI_3 -кінази), що знижувався під дією вортманіну.

Використання субтип-специфічних лігандів показало, що в мітохондріях $\alpha 7\beta 2$ nAHP більшою мірою залучений до активації $\text{PI}_3\text{K}/\text{Akt}$ -кіназного шляху сигналювання, і менше - CaMKII та Src-кіназного. На відміну, $\alpha 3\beta 2$ та $\alpha 4\beta 2$ nAHP менше залучені до активації $\text{PI}_3\text{K}/\text{Akt}$ -кіназного шляху сигналювання, а більше до CaMKII та Src-кіназного. Різні субтипи nAHP можуть бути залучені до різних внутрішньомітохондрійних шляхів сигналювання з різною ефективністю [161]. Ці дані було підтверджено в роботі *Chernyavsky et al.*, які також показали, що $\alpha 7$ - та $\alpha 4$ -вмісні nAHP зв'язані із PI_3K та Src-кіназами мітохондрій, залученими до вивільнення Цит С за дії H_2O_2 [163]. На основі раніше отриманих даних було запропоновано схему сигналювання мітохондрійних nAHP, представлену на Рис. 1.8 [161].

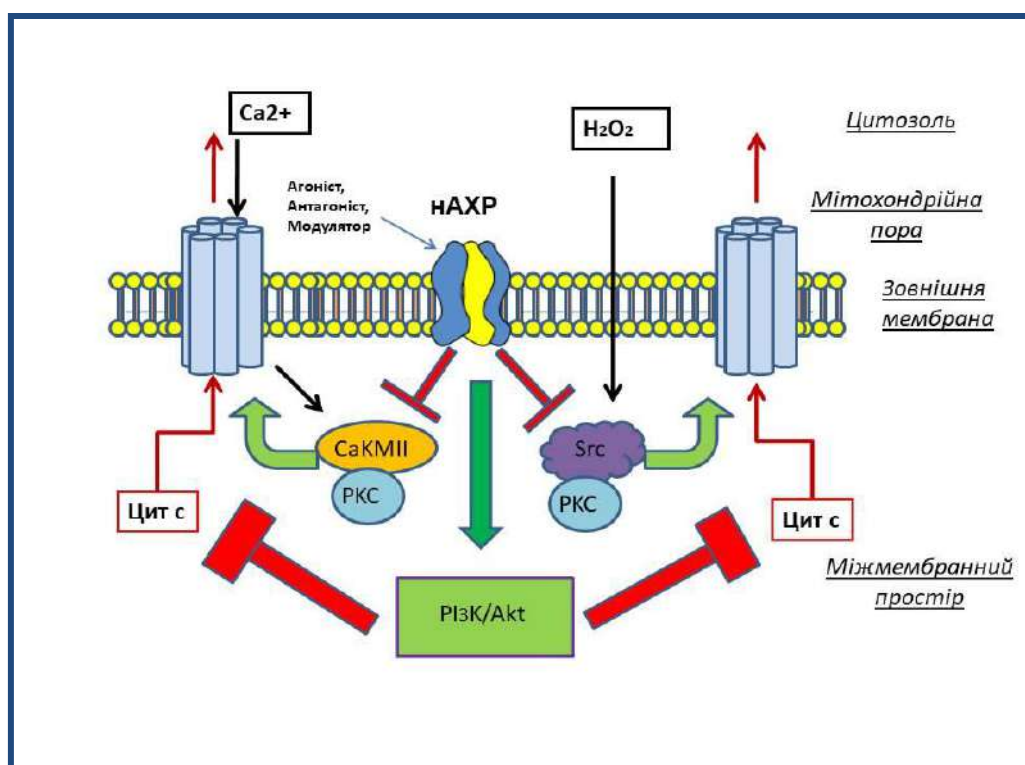


Рис 1.8. Схема механізму сигналювання nAHP, локалізованих у мітохондріях, запропонована *Gergalova et al.* (2014) [4].

Отримані дані свідчили про важливу роль нАХР в регуляції початкових етапів мітохондрійного шляху апоптозу. Однак багато питань, пов'язаних із біосинтезом, сигналюванням та фізіологічною роллю внутрішньоклітинних нАХР залишались нез'ясованими і стали предметом цієї дисертаційної роботи.

Зокрема, дослідження були спрямовані на визначення:

- особливостей сигналювання різних субтипів нАХР;
- шляхів біосинтезу і транспортування нАХР в мітохондрії;
- ролі мітохондрійних нАХР у різних патологічних процесах.

Розділ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Експериментальні тварини

Експериментальну частину роботи було проведено на мишах дикого типу лінії C57Bl/6, мутантних мишах, у яких нокаутований ген $\alpha 3$ -, $\alpha 7$ -, $\beta 2$ - або $\beta 4$ -субодиниць nAHR, отриманих на основі лінії C57Bl/6J [164], [165], [166] та щурах лінії Вістар.

Тварини утримувались в віваріях Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна (Київ, Україна) та Інституту Пастера (Париж, Франція) в оптимальних світлових (12 год світловий день) та температурних ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) умовах. Тварини були забезпечені водою і гранульованим кормом *ad libitum*. Тварин виводили з експерименту шляхом цервікальної дислокації або декапітації та відбирали їх печінку, мозок для досліджень. Всі процедури з експериментальними тваринами проводились згідно рекомендацій Комісії по утриманню та використанню лабораторних тварин Інститутів, де проходили відповідні дослідження.

2.2. Матеріали та реактиви

У роботі застосовували такі реактиви: HEPES, сукцинат натрію, МЛА, PNU282987, ЕГТА, пероскидаза хрону, Triton®-20, ExtrAvidin®-Cy3™, коктейль інгібіторів протеаз, ОФД фірми Sigma (Sigma-Aldrich) (США); Кролячі антитіла до VDAC/Porin (V2139, Sigma-Aldrich, США), курячі IRE-1 α (SC-20790, Santa Cruze Biotechnology, США), кролячі антитіла до ядерного ламіну B1 (ab90169, Abcam, США). PNU-120596, NS-1738 та десформілфлустрабромін гідрохлорид (dFBr) фірми Tocris Bioscience (Bristol, UK), дигідро- β -еритроїдин (Dh β E) та PNU-282987 фірми Sigma (Sigma-Aldrich). 4BP-TQS був наданий М.Гіллом (Інститут Пастера, м. Париж). РАМ-2, -3, та -4, похідні коронаридину (\pm)18-МС та (+)-катарантин були синтезовані та/або надані доктором Х. Аріасом (H.R.Arias) (California Northstate University College of Medicine, Elk Grove CA, США).

Всі інші реактиви були кваліфікації х.ч. і ч.д.а. вітчизняного виробництва. Для приготування водних розчинів та середовища інкубації застосовували дистильовану воду.

Антитіла проти фрагментів $\alpha 7(1-208)$, $\alpha 3(181-192)$, $\alpha 4(181-192)$, $\alpha 7(179-190)$, $\alpha 9(11-23)$, $\beta 2(190-200)$ або $\beta 4(190-200)$ субодиниці НАХР були отримані та охарактеризовані у відділі молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна (Київ, Україна) раніше [167], [168], [169], [170]. Антитіла проти фрагменту $\alpha 10(404-417)$ субодиниці НАХР були подаровані д. В.Куммером (Університет ім. Юстуса Лібіха, Гіссен, Німеччина) [171]. Всі антитіла були біотинільовані за стандартним протоколом [172]. Сироватка крові миші, яка містила антитіла проти Цит С бика, була надана к.б.н. Л. Сидорик (Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ).

2.3. Виділення та характеристика мітохондрійної фракції та фракції збідненої на мітохондрії

Мітохондрії одержували з мозку або печінки гризунів за допомогою методу диференційного центрифугування [3].

Тварин виводили з експерименту шляхом цервікальної дислокації. Печінку або мозок виймали та гомогенізували у буфері (10мМ HEPES, pH 7.4; 200мМ сахарози, 1мМ EGTA) у скляному гомогенізаторі. Отриманий гомогенат відповідних органів осаджували методом центрифугування протягом 10 хвилин при 1 500 x g. Осад збирали та використовували у експериментах як фракцію, що збіднену на мітохондрії (не-мітохондрійна фракція).

Для отримання мітохондрій надосад переливали до нових центрифужних пробірок. Після цього двічі центрифугували по 10 хвилин при 8000 x g. Осад (мітохондрії) збирали і використовували в експериментах. Чистоту одержаних фракцій характеризували методом Сендвіч-імуноферментного аналізу (Сендвіч-ІФА). Для цього в 96-лункові планшети (Nunc Maxisorb, Roskilde, Данія) вносили антитіла специфічні до VDAC, IRE-1 α та ядерного ламіну 1B.

Проявляли біотинильованими антитіла специфічні до VDAC, IRE-1 α та ядерного ламіну 1B.

2.4. Отримання препаратів лізатів мітохондрійної фракції та фракції збідненої на мітохондрії

Для дослідження субодиничного складу нАХР фракцію мітохондрій та не-мітохондрійну фракцію попередньо заморожували при -20°C , розморожували та ресуспензували у буфері для лізису (0.01 M Tris-HCl, pH 8.0; 0.14 M NaCl; 0.025% NaN₃; 1% Tween-20 та коктейль інгібіторів протеаз) протягом 2 годин при 4°C . Після цього проби центрифугували (20 хв при 20,000 x g). Концентрацію білку у надосаді визначали за допомогою комерційного набору BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific, Rockford, США).

2.5. Дослідження субодиничного складу нАХР методом Сендвіч-ІФА

Для визначення субодиничного складу нАХР з ізольованих мітохондрій та у фракції, що не містила мітохондрій, у планшети для Сендвіч-ІФА (Nunc Maxisorb, Roskilde, Данія) вносили $\alpha 7(1-208)$ -специфічні антитіла (30 мкг/мл при 4°C , на ніч). Блокували 1% BSA/PBS протягом (1 год, 37°C). Після цього детергентні лізати досліджуваних препаратів (100 мкг білка/мл) наносили у лунки (2 год, 37°C). Плашки промивали водою та наносили біотинильовані $\alpha 3(181-192)$ -, $\alpha 4(181-192)$ -, $\alpha 7(179-190)$ -, $\alpha 9(11-23)$ -, $\alpha 10(404-417)$ -, $\beta 2(190-200)$ або $\beta 4(190-200)$ -специфічні антитіла (2 год, 37°C). Після чого зв'язані антитіла проявляли кон'югатом стрептавідину з пероксидазою хрому. Оптичну щільність визначали при довжині хвилі 490 нм (Stat-Fax2100 Microplate reader, Awarness Technology, FL, США).

Концентрація кожних антитіл була попередньо підібрана відповідно до титрувальної кривої: 1:200 для $\alpha 3$ -специфічних антитіл, 1:80 – для $\alpha 4$ -специфічних, 1:300 – для $\alpha 7$ -специфічних, 1:250 – для $\alpha 9$ -специфічних, 1:250 –

для α 10-специфічних, 1:500 – для β 2-специфічних і 1:200 – для β 4-специфічних. Вихідна концентрація всіх антитіл була 2 мкг/мл.

2.6. Дослідження вивільнення цитохрому *c* з мітохондрій із використанням Сендвіч-ІФА

Ізольовані мітохондрії (у буфері: 10мМ HEPES, рН 7,4; 125 мМ KCl, 25 мМ NaCl, 5 мМ сукцинату) інкубували 5 хв з різними апоптогенними факторами (Ca^{2+} , H_2O_2 , вортманіном) за кімнатної температури. Концентрацію білку у мітохондрійній фракції визначали за допомогою комерційного набору BSA Protein Assay kit (Thermo Scientific, Rockford, США). Агоністи, антагоністи або алостеричні модулятори hAXP додавали за 2-3 хв до додавання апоптогенних факторів; у середовищі інкубації (при 20-22°C). Після цього препарат центрифугували 10 хв при 7000 x g (4°C). Надосад мітохондрій відбирали і досліджували методом Сендвіч-ІФА.

Планшети для Сендвіч-ІФА покривали поліклональними антитілами проти Цит С (виділеними із імунної сироватки миші шляхом висолювання 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), вільні місця блокували 1% БСА/PBS. На адсорбовані антитіла наносили надосад мітохондрій або бичачий цитохром *c* (0,52 – 41,5 нМ) і інкубували протягом 18 год при 4°C. Зв'язаний Цит С виявляли біотинільованими антитілами проти Цит С та кон'югатом стрептавідину з пероксидазою хрому. Пероксидазну активність визначали за допомогою ОФД, вимірювання оптичної густини при 490 нм проводили на планшетному рідері StatFax-2100 (Awareness Technology, США).

2.7. Дослідження складу вуглеводного компоненту $\alpha 7$ нАХР методом Сендвіч-лектин-ІФА

Для визначення складу вуглеводного компоненту $\alpha 7$ нАХР планшети для Сендвіч-ІФА покривали $\alpha 7(179-190)$ -специфічними антитілами (30 мкг/мл при 4°C, на ніч). Блокували 1% BSA/PBS протягом (1 год, 37 °C). Після цього детергентні лізати досліджуваних препаратів (70 мкг білка/мл, додатково оброблені 2%ДСН (додецил сульфат натрію) для руйнування можливих зв'язків нАХР з іншими білками) наносили у лунки (2 год, 37 °C). Плашки промивали водою та наносили біотинільовані лектини: лектин із *Laburnum anagroids* (LABA), специфічний до залишків фукози; лектин із *Sambucus nigra* (SNA), специфічний до сіалових кислот; peanut agglutinin (PNA), специфічний до галактози; wheat germ agglutinin (WGA), специфічний до N-ацетилглюкозаміну; та лектин із *Artocarpus integrifolia* (Jacalin), специфічний до O-зв'язаних гліканів. Після чого зв'язані антитіла проявляли кон'югатом стрептавідину з пероксидазою хрому. Оптичну щільність визначали при довжині хвилі 490 нм (Stat-Fax2100 Microplate reader, Awarness Technology, FL, США).

Для визначення вмісту $\alpha 7$ нАХР у досліджуваних зразках у планшети для Сендвіч-ІФА (Nunc Maxisorb, Roskilde, Данія) вносили $\alpha 7(1-208)$ -специфічні антитіла (30 мкг/мл при 4°C, на ніч). Блокували 1% БСА/PBS протягом (1 год, 37 °C). Після цього детергентні лізати досліджуваних препаратів (100 мкг білка/мл) наносили у лунки (2 год, 37 °C). Плашки промивали водою та наносили біотинільовані $\alpha 7(179-190)$ -специфічні антитіла (2 год, 37 °C). Після чого зв'язані антитіла проявляли кон'югатом стрептавідину з пероксидазою хрому (Рис. 2.1). Оптичну щільність визначали при довжині хвилі 490 нм (Stat-Fax2100 Microplate reader, Awarness Technology, FL, США).

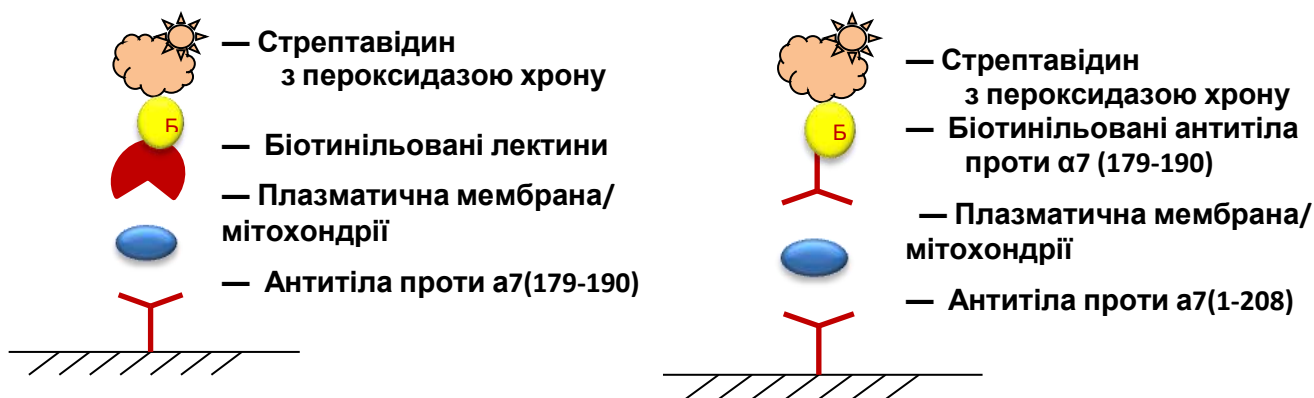


Рис. 2.1 Схематичне зображення дослідження вуглеводного складу нАХР методом Сендвіч-лектин-ІФА.

2.8. Дослідження впливу нікотину на нАХР мітохондрій печінки мишей

Для вивчення дії нікотину *in vivo* було сформовано дослідну та контрольну групи мишей лінії C57Bl/6 (по п'ять тварин в групі). Тварини з дослідної групи вживали нікотин, розведений у воді (200 мкл/л) *ad libitum* протягом 7 днів. Контрольна група тварин вживала питну воду. У тварин з дослідної групи доступу до питної води без нікотину протягом цього періоду не було. Через 7 днів від початку експерименту мишей виводили з експерименту шляхом цервікальної дислокації, печінку виймали для подальшого аналізу.

2.9. Моделювання часткової гепатектомії та лапаротомії

Самці щурів лінії Вістар (200–250г) були прооперовані під анестезією ефіром згідно стандартних процедур [173], [174]. Черевна порожнина тварини була обережно відкрита. Тварини були поділені на дві групи: першій було проведено операцію часткову гепатектомію (ЧГЕ), щурам з другої групи – операцію лапаротомію. Під час часткової гепатектомії, медіальна та ліва бокова частина печінки були відрізані та в подальшому були використані в якості контролю для порівняння з печінкою, що регенерує. Після цього черевна порожнина була зашита одношаровим швом. Під час лапаротомії, жодних частин печінки не було вилучено, а черевна порожнина була зашита так само, як

і під час операції з частковим видаленням печінки. Після операції тварини отримували однократно ін'єкцію дексалгіну (Dexalgin) (0,33 мг на кг маси тіла), повертали до клітки та отримували звичайний корм та воду *ad libitum*. Тварин виводили з есперименту шляхом декапітації під анестезією ефіром через 3, 6, 12 та 24 години після операції.

2.10. Дослідження впливу гострого запалення на мітохондрійні НАХР

Двом групам мишей лінії C57Bl/6 вводили внутрішньочеревно бактеріальний ліпополісахарид (ЛПС) (*E.coli* 055:B5, Sigma-Aldrich) у дозі 30 мкг/мишу (розчиняли у PBS) у 0 та 2 день експерименту. Одній з груп мишей додатково вводили внутрішньовенно $\alpha 7(1-208)$ -специфічні антитіла (200 мкг/мишу у фізіологічному розчині) на 0, 1 та 2 день експерименту. Контрольна група тварин залишалась інтактною. На третій день експерименту тварин виводили з експерименту шляхом цервікальної дислокації; мозок виймали та використовували для подальших досліджень.

2.11. Дослідження впливу N-стероїлетаноламіну (NSE) на мітохондрійні НАХР

Двом групам мишей лінії C57Bl/6 (по 10 тварин в групі) вводили внутрішньочеревно бактеріальний ліпополісахарид (ЛПС) (*E.coli* 055:B5, Sigma-Aldrich) у дозі 2 мг/кг у 0,1 мл фізіологічного розчину (0,9% NaCl), двічі, з інтервалом у 4 тижні. NSE у дозі 50 мг/кг, 50 мкл, вводили *per os* тваринам з однієї з груп протягом 9 днів: 4 дні до та 5 днів після введення ЛПС [175].

Для вивчення ефекту NSE у $\alpha 7(1-208)$ -імунізованих мишей, три групи мишей (по 9 тварин у кожній групі) були імунізовані рекомбінантним $\alpha 7(1-208)$ (по 50 мкг на мишу у 0,2 мкл повного адюванту Фрейнда). Повторну імунізацію проводили на 21-й день день емульсією $\alpha 7(1-208)$ НАХР з неповним адювантом Фрейнда. Для вивчення ефекту NSE одна група $\alpha 7(1-208)$ -імунізованих мишей

отримувала NSE (у дозі 50мг/кг, 50мкл/миша) per os протягом 9 днів перед кожною імунізацією. Інша група тварин отримувала таку ж дозу NSE протягом 7 днів після кожної імунізації. Третя група тварин не отримувала NSE.

Четверта група тварин залишалась інтактною (не отримувала ні імунізації, ні ЛПС).

Мишей перевіряли у поведінковому тесті «Розпізнання нового об'єкту», після чого виводили з експерименту шляхом цервікальної дислокації. Мозок гомогенізували у скляному гомогенізаторі і використовували для подальших досліджень.

2.12. Поведінковий тест «Розпізнавання нового об'єкту»

Мишей тестували у поведінковому тесті «Розпізнання нового об'єкту», який є відображенням стану їх епізодичної пам'яті. У цьому тесті, мишей по одній попередньо поміщали у замкнений простір з двома однаковими об'єктами і давали можливість ретельно їх дослідити протягом 10 хвилин (ознайомча сесія). Після перерви (10 хвилин) один з об'єктів заміняли на новий, що мав подібні розміри, але відрізнявся за формою, кольором та матеріалом і фіксували кількість досліджень нового і старого об'єкту 10 хвилин (тестова сесія). Стан епізодичної пам'яті характеризувався за індексом дискримінації (ІД), що розраховувався як відношення різниці у кількості досліджень твариною нового та старого об'єктів у тестовій сесії до сумарної кількості досліджень обох однакових об'єктів в ознайомчій сесії .

2.13. Статистичний аналіз експериментальних даних

Експерименти повторювали 3 – 5 разів, кількість паралельних на одну точку брали не менше 3. Статистичні розрахунки (обчислення середніх значень та стандартної похибки, статистичний аналіз достовірності відмінності величин всіх описаних експериментів за стандартним критерієм t–тесту Ст'юдента,

Mann-Whitney або One-way ANOVA та побудову графіків здійснювали в режимі програмного забезпечення Origin Pro 9.0. Всі результати експериментів виражені як значення \pm стандартна похибка. Значення при $p < 0,05$ розглядались як достовірні.

РОЗДІЛ 3. Результати та обговорення

3.1. Будова мітохондрійних nAHR. Сигнал для направлення nAHR у мітохондрії.

3.1.1. Дослідження вуглеводного компоненту nAHR плазматичної мембрани та мітохондрій.

Мітохондрійні nAHR – це перший приклад виявлення цих функціональних рецепторів у внутрішньоклітинному компартменті. Перш за все ми поставили питання, що є сигналом для направлення одних новосинтезованих nAHR на плазматичну мембрану клітини, а інших – на мітохондрії. nAHR є пентамерним глікопротеїном, кожна субодинаця якого містить вуглеводневий залишок, зв'язаний N-глікозидним зв'язком з субодинацею через залишок Аспарагіну, розташованого у позаклітинному домені. Додавання вуглеводневої компоненти до рецептора відбувається в ході посттрансляційних модифікацій [176].

Було припущено, що сигналом, який направляє рецептори у різні компартменти клітини, може бути саме склад вуглеводного компоненту. Для цього ми порівняли вуглеводні залишки $\alpha 7$ субодинаці nAHR, експресованої у плазматичній мембрані або у мітохондріях. Для цього були отримані препарати плазматичної мембрани (ПМ) та мітохондрій мозку щурів, відповідно до загальноприйнятих процедур [177], [3]. Отримані ПМ та мітохондрії аналізували у тесті Сендвіч-ІФА з використанням лектинів. На дно плашки наносили антитіла до $\alpha 7$ субодинаці nAHR, а проявляли біотинільованими лектинами, специфічними до різних вуглеводневих залишків. Лектини – це група білків, які дуже специфічно зв'язуються з певними вуглеводними залишками [178]. Ми використали лектини рослинного походження: лектин із *Laburnum anagroids* (LABA), специфічний до залишків фукози; лектин із *Sambucus nigra* (SNA), специфічний до сіалових кислот; peanut agglutinin (PNA), специфічний до галактози; wheat germ agglutinin (WGA), специфічний до N-

ацетилглюкозаміну; та лектин із *Artocarpus integrifolia* (Jacalin), специфічний до О-зв'язаних гліканів. Вміст $\alpha 7$ субодиниці виявляли антитілами проти фрагменту $\alpha 7(179-190)$. Значення оптичної густини, отримані від лектинів, були нормалізовані відповідно до оптичної густини від $\alpha 7$ -специфічних антитіл у кожному зразку.

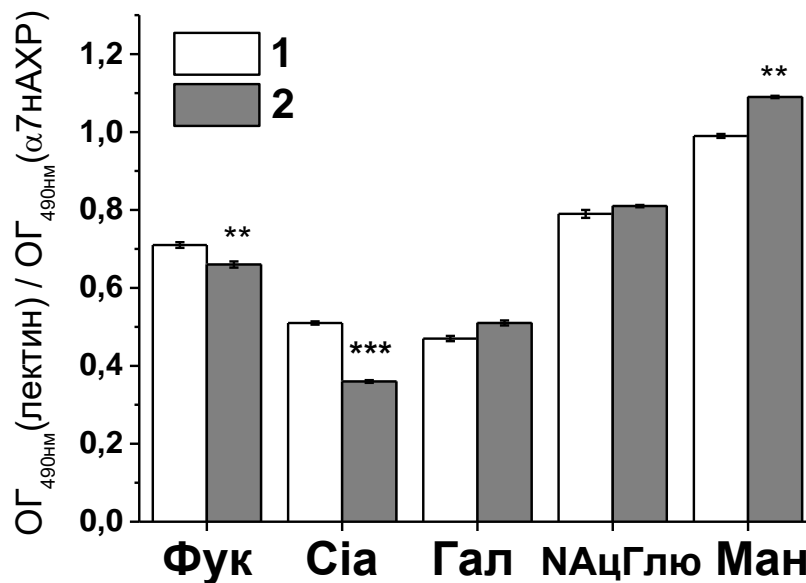


Рис. 3.1 . Склад вуглеводного залишку, зв'язаного з $\alpha 7$ субодиницею НАХР, виділених з мітохондрій (1) та плазматичної мембрани (2) мозку щурів. Фук – залишки фукози, Сіа – залишки сіалових кислот, Гал – залишки галактози, НАцГлю - N-зв'язаний ацетилглюкозамін, Ман – залишки манози. ** - $p < 0.005$, *** - $p < 0.0005$ у порівнянні з $\alpha 7$ НАХР мітохондрій.

Як показано на Рис 3.1, мітохондрійні $\alpha 7$ НАХР не відрізнялися від НАХР плазматичної мембрани за вмістом N-ацетилглюкозаміну (WGA) та галактози (PNA). Вміст сіалових кислот (SNA) та фукози (LABA) був вищий на 27% та 7% відповідно у $\alpha 7$ НАХР, виділених з мітохондрій, порівняно з $\alpha 7$ НАХР плазматичної мембрани [178]. При цьому вміст залишків манози був вищим на 10% у $\alpha 7$ НАХР, виділених з плазматичної мембрани, ніж у $\alpha 7$ НАХР мітохондрій.

Ці дані дозволяють зробити важливий висновок: мітохондрійні nAHR, подібно до nAHR плазматичної мембрани, проходять пост-трансляційні модифікації у апараті Гольджі (транс-компартменті Гольджі), де залишки O-зв'язаних гліканів та сіалових кислот прикріплюються до протеїнової компоненти рецептора [179]. Вуглеводний залишок (додаткове сіалування та фукозилування), вірогідно, є сигналом для направлення молекул новосинтезованого nAHR до мітохондрій, а не до плазматичної мембрани.

3.1.2. Дослідження впливу нікотину на субодиничний та вуглеводний склад і функціонування nAHR у мітохондріях печінки

Відомо, що нікотин підвищує рівень синтезу різних субтипів nAHR: в якості внутрішньоклітинного «шаперону» нікотин сприяє збиранню окремих субодиниць рецептора у пентамер, фолдингу та дозріванню nAHR в процесі біосинтезу [29]. Крім того, нікотин посилює глікозилування білків [180], [181]. Завдяки своїй ліпофільній природі, нікотин легко проникає через мембрану клітини і може безпосередньо впливати на внутрішньоклітинні nAHR.

Питання було в тому, щоб з'ясувати, чи впливає нікотин на експресію, будову, глікозилування та функціонування nAHR у мітохондріях.

Миші вживали нікотин, розчинений у воді, протягом 7 днів. Після цього їх умертвляли, і печінку гомогенізували та методом диференційного центрифугування розділяли на дві фракції: мітохондрійну та фракцію, збіднену на мітохондрії (не-мітохондрійну). Чистоту фракцій контролювали методом Сендвіч-ІФА з використанням антитіл, специфічних до протеїнів, що є характерними (маркерами) для певних компартментів клітини: ламіну 1B (ядра), VDAC (мітохондрії) та IRE-1 α (ендоплазматичний ретикулум). Як показано на Рис. 3.2, фракція мітохондрій характеризувалася значним вмістом VDAC; сигнал від ламіну 1B та IRE-1 α був незначний. Напроти, не-мітохондрійна фракція містила значну кількість ламіну 1B та IRE-1 α , а вміст VDAC був незначним [182]. Отримані дані показують практичну відсутність

домішків клітинних ядер та мембран ендоплазматичного ретикулюма в одержаній фракції мітохондрій. Ми не визначали спеціально наявність домішків плазматичної мембрани, оскільки відомо, що нАХР плазматичної мембрани складають лише до 15% загального вмісту нАХР в клітині [29].

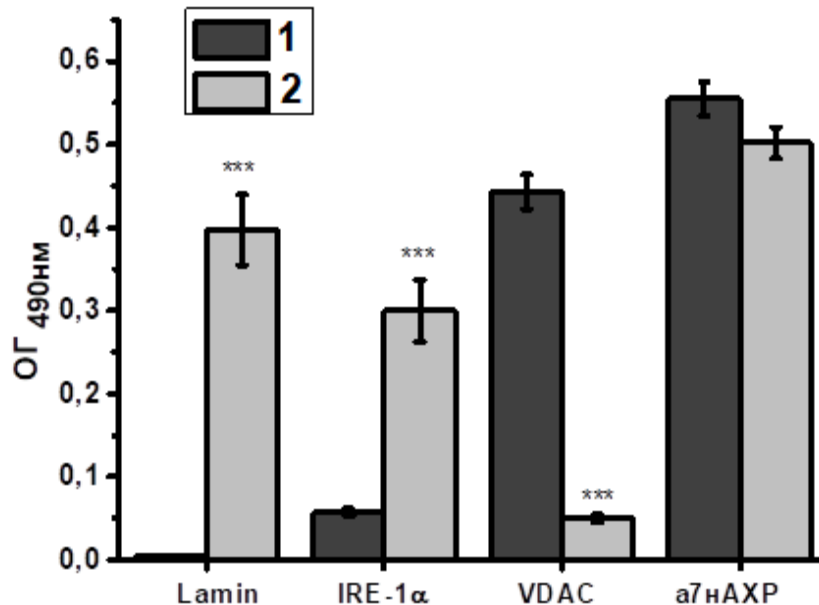


Рис. 3.2. Порівняння вмісту ламіну 1В, IRE-1 та VDAC у мітохондрійній (1) та не-мітохондрійній (2) фракціях. *** - $p < 0.0005$ у порівнянні з мітохондрійною фракцією.

Для того, щоб перевірити, як впливає вживання нікотину на вміст нАХР у печінці, ми порівняли фракцію, збіднену на мітохондрії, отриману з печінки мишей, що вживали нікотин, та контрольних мишей у SDS електрофорезі. Як показано на Рис. 3.3, зразки, отримані від обох груп мишей, містили однакову кількість протеїнів з молекулярною вагою 85 кДа, 40 кДа або 30 кДа (відмічені на Рис. 3.3 тонкими стрілками). Однак смужка, що відповідає протеїну вагою 50-60 кДа (таку само вагу мають нАХР субодиниці [183]), була значно меншою у зразках, виділених з печінки тварин, які вживали нікотин, порівняно з контрольними зразками (товста стрілка)[182].

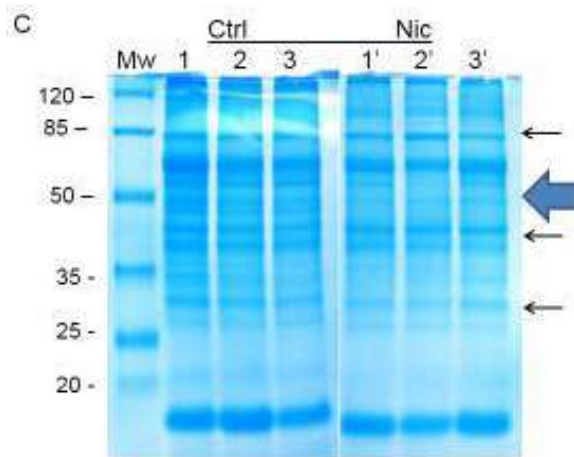
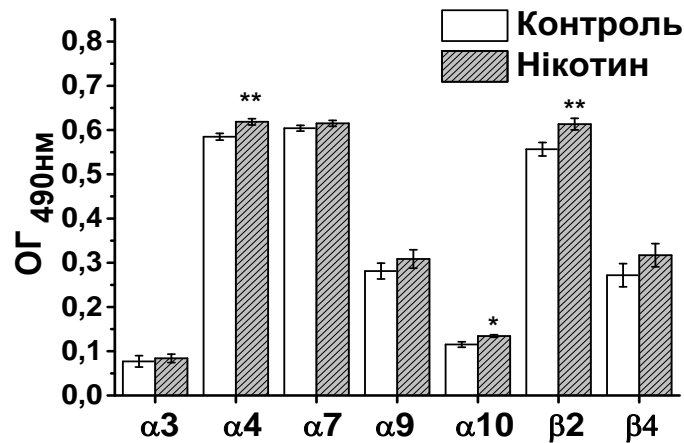


Рис. 3.3. Електрофореграма (фарбування Кумассі) не-мітохондрійних фракцій печінки 3 контрольних мишей (Ctrl, 1-3) та 3 мишей, що вживали нікотин (Nic, 1'-3'). Стрілками позначено лінії схожої (тонкі стрілки) та відмінної (товста стрілка) інтенсивності. Mw – маркер #26612 (Termofisher Scientific)

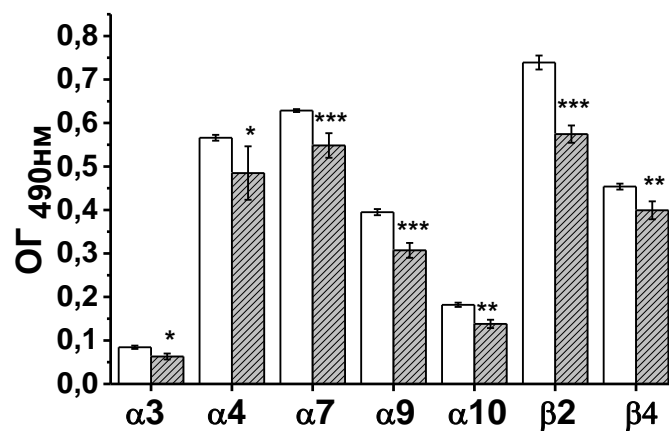
Рівень НАХР у фракції, збагаченій на мітохондрії, та у не-мітохондрійній фракції аналізували за допомогою антитіл, специфічних до різних субодиниць НАХР у Сендвіч-ІФА. Було показано, що, за однакової кількості внесеного протеїну, у не-мітохондрійній фракції, виділеній з печінки мишей, що вживали нікотин, містилась менша кількість усіх субодиниць НАХР порівняно з мітохондріями мишей з контрольної групи (Рис. 3.4), що відповідає даним, отриманим методом електрофорезу (Рис. 3.3). На відміну, у мітохондрійній фракції печінки мишей, які вживали нікотин, було більше $\alpha 4$, $\alpha 10$ та $\beta 2$ субодиниць НАХР та рівні кількості інших субодиниць [182].

У середньому, співвідношення сигналів оптичної густини для мітохондрійних та не-мітохондрійних субодиниць НАХР становило $0,78 \pm 0,06$ в групі контрольних тварин та $1,09 \pm 0,08$ у тварин, що вживали нікотин ($p = 0,008$; $n = 5$).

Ці дані свідчать, що вживання нікотину сприяло перерозподілу внутрішньоклітинних НАХР, особливо підтипу $\alpha 4\beta 2$, на користь мітохондрій.



А



Б

Рис. 3.4. Субодиничний вміст nAChR у мітохондрійній (А) та не-мітохондрійній (Б) фракціях печінки мишей, що вживали нікотин (Нікотин), та мишей контрольної групи (Контроль); визначено методом Сендвіч-ІФА ($n = 5$ для кожної групи) * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, та *** $p < 0.0005$ порівняно з контролем.

Для вивчення вмісту вуглеводних залишків мітохондрійних та не-мітохондрійних $\alpha 7$ nAChR з печінки піддослідних мишей ми використали Сендвіч-лектин-ІФА за схемою, описаною у розділі 2.7. Як показано на Рис. 3.5, $\alpha 7$ субодиниці nAChR з фракції, збагаченої мітохондріями, мали значно вищий сигнал від лектинів з *Laburnum anagroids* (LABA) та *Sambucus nigra* (SNA) і, відповідно, містили більше залишків фукози та сіалової кислоти у порівнянні з

$\alpha 7$ субодиницями nAХР не-мітохондрійної фракції. Мітохондрійні $\alpha 7$ субодиниці nAХР мишей, що вживали нікотин, містили більше залишків фукози, тоді як не-мітохондрійні $\alpha 7$ субодиниці – більше залишків сілової кислоти, порівняно з мітохондрійними $\alpha 7$ субодиницями [182]. Таким чином, мітохондрійні nAХР виявилися більш глікозильованими (що відповідало даним, представленим вище на Рис. 3.1), а вживання нікотину збільшувало фукозилування мітохондрійних та сіалування не-мітохондрійних $\alpha 7$ nAХР.

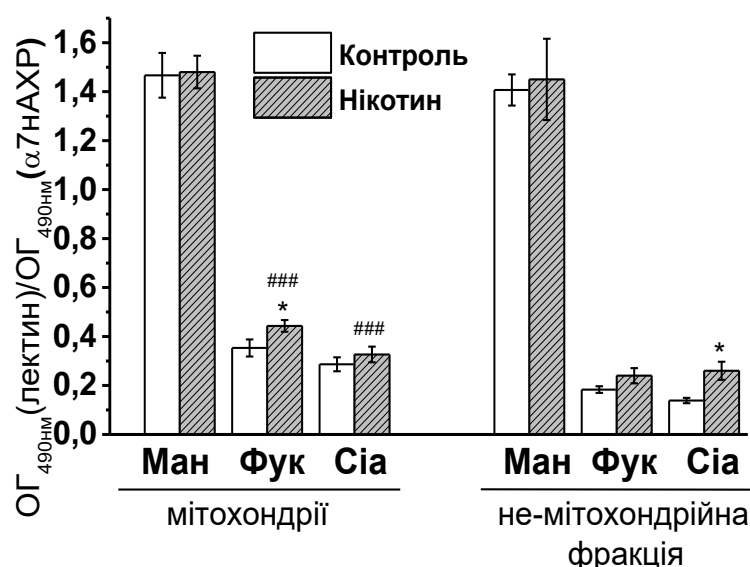


Рис 3.5. Вміст вуглеводних залишків, зв'язаних з $\alpha 7$ субодиницею nAХР з мітохондрійної та не-мітохондрійної фракцій печінки мишей, що вживали нікотин (Нікотин), та мишей контрольної групи (Контроль); визначено методом Сандвіч-лектин-ІФА ($n = 5$ для кожної групи), * - $p < 0.05$ порівняно з препаратом печінки контрольних мишей, ### - $p < 0.0005$ порівняно з не-мітохондрійною фракцією.

У функціональному тесті ми перевіряли рівень вивільненого цитохрому с (Цит С) з мітохондрій під дією різних доз Ca^{2+} . У даному експерименті мітохондрії печінки контрольних мишей та тих, що вживали нікотин, вивільняли майже однакову кількість Цит С під дією Ca^{2+} (Рис. 3.6, А). Проте в мітохондріях мишей, що вживали нікотин, вивільнення Цит С стимульованого $0,9 \text{ мкМ } \text{Ca}^{2+}$ пригнічувалось PNU-282987 ($\alpha 7$ -специфічний агоніст) або PNU-

120596 ($\alpha 7$ -специфічний позитивний алостеричний модулятор 2-ого типу) менш ефективно порівняно з мітохондріями контрольних мишей (Рис. 3.6, В, Г). Крім того, вивільнення Цит С, стимульованого вортманіном, менш ефективно пригнічувалось dFBr ($\beta 2$ -специфічний позитивний алостеричний модулятор

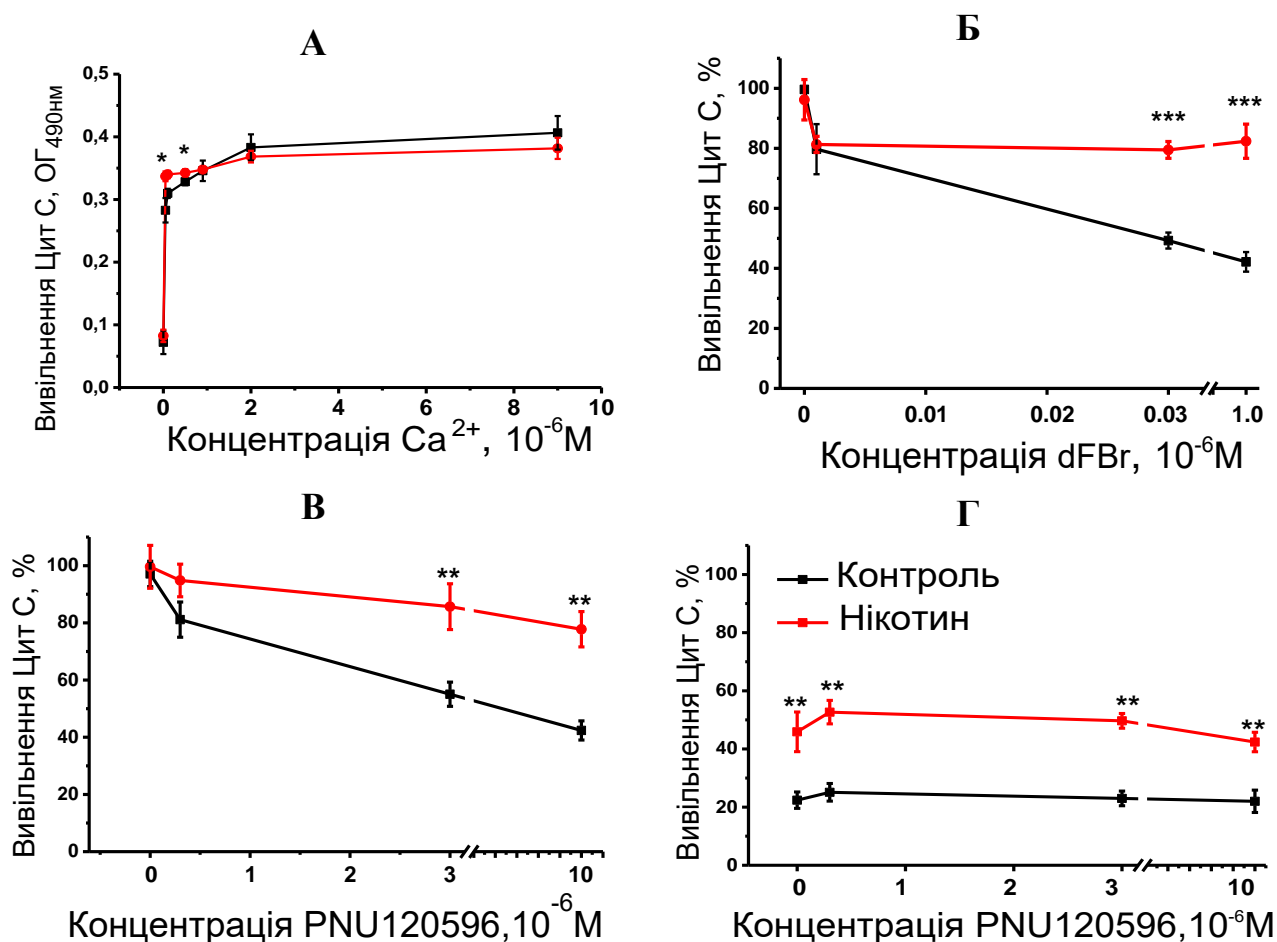


Рис. 3.6. Вивільнення цитохрому с (Цит С) з мітохондрій печінки контрольних мишей (Контроль) та мишей, що вживали нікотин (Нікотин), під дією Ca^{2+} (А), у присутності dFBr під дією вортманіну (Б), під дією Ca^{2+} у присутності PNU120596 (В) або PNU120596 + PNU-282987(Г). $n = 5$ для кожної групи, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ порівняно з контролем. За 100% прийнято рівень вивільнення Цит С без дії жодних чинників.

2ого типу) у порівнянні з мітохондріями контрольних мишей (Рис. 3.6, Б) [182]. Ці дані вказують на те, що мітохондрійні nAХР, виділені з печінки мишей, що вживали нікотин, були менш чутливими до дії nAХР-селективних лігандів.

Загалом, отримані дані свідчать про те, що вживання нікотину збільшувало глікозилування $\alpha 7$ nAChR та сприяло посиленому направленню nAChR печінки до мітохондрій, однак робило nAChR мітохондрій менш чутливими до дії специфічних агоністів та алостеричних модуляторів.

Феномен посилення синтезу nAChR під дією нікотину добре відомий. Нікотин полегшує збирання пентаметру nAChR, не впливаючи при цьому на його експресію на поверхні клітини [29]. Перенаправлення nAChR до мітохондрій під дією нікотину супроводжувалось посиленням фукозилування мітохондрійних $\alpha 7$ субодиниць, а також посиленням сіалування не-мітохондрійних $\alpha 7$ субодиниць у печінці мишей. Таким чином, різниця між мітохондрійним та не-мітохондрійним шляхом направлення nAChR може залежати від кількості залишків фукози та сіалових кислот у $\alpha 7$ субодиниці nAChR. Відповідно до механізмів пост-трансляційних модифікацій білків, описаних в літературі, залишки фукози додаються до білкового кору у *medial*-компаратменті апарату Гольджі, а залишки сіалових кислот – у *trans*-компаратменті [184]. Тому збільшення мітохондрійних $\alpha 7$ nAChR може визначатися у *medial*-компаратменті апарату Гольджі під час посттрансляційної модифікації. Значних відмінностей у складі вуглеводного залишку $\beta 2$ субодиниці nAChR у контрольних мишей і у мишей, які вживали нікотин, не спостерігалось (Рис 3.4), хоча *Sallette et al.* (2005) припускали, що нікотин стимулює збільшення вмісту саме $\beta 2$ субодиниці [29]. Але мітохондрійні nAChR – є гетеромерами ($\alpha 3\beta 2$, $\alpha 4\beta 2$ та $\alpha 7\beta 2$) [161], а тому сигнальна вуглеводна компонента може бути розташована саме на α субодиниці. Мітохондрійні nAChR печінки мишей, що вживали нікотин, виявилися менш чутливими до специфічних лігандів (які знижують вивільнення Цит С): $\alpha 7$ -специфічного агоністу PNU-282987, $\alpha 7$ -специфічного PAM PNU-120596 та $\beta 2$ -специфічного PAM dFBr (Рис 3.6). Ці явища можуть бути пов'язані або з прямим впливом нікотину на мітохондрійні nAChR, або з посттрансляційними модифікаціями молекул nAChR, викликаними ніотином. Нікотин, який хронічно присутній у печінці мишей, що вживають нікотин, може десенсибілізувати або навіть

інактивувати мітохондрійні nAХР на довгий період [185]. Сигналювання мітохондрійних nAХР відбувається при виникненні певних конформаційних змін, що викликаються зв'язуванням функціонально різних лігандів та в подальшому активують внутрішньомітохондрійні кінази [4]. Меншу ефективність PNU-120596 та dFBr, РАМів, які зв'язуються з алостеричними сайтами, відмінними від сайту, зв'язування агоністів, можна пояснити тим, що десенсибілізований (інактивований) стан nAХР може бути менш здатним до таких конформаційних рухів [186], [187]. Альтернативно, надмірне глікозилювання може змінити структуру або гнучкість пентамера nAХР, щоб запобігти його взаємодії з специфічними лігандами.

Вуглеводневий залишок, що приєднаний до амінокислотного залишку Asn110, був визначений у ацетилхолін-зв'язувальному протеїні, який аналогічний структурі та функціям позаклітинної частини nAХР і знаходиться в межах ділянки зв'язування α -бунгаротоксину [188]. Показано, що вуглеводні залишки забезпечують належне складання α субодиниць nAХР та формування сайтів зв'язування α -бунгаротоксину [40], [189]. Незважаючи на те, що деглікозилювання у цьому сайті не змінює здатності рекомбінантного позаклітинного домену (1-208) $\alpha 7$ nAХР зв'язувати α -бунгаротоксин, це впливає на ділянку $\alpha 7$ субодиниці (179-190), яка знаходиться близько до ацетилхолін- та α -бунгаротоксин-зв'язуючих фрагментів $\alpha 7$ субодиниці.

Додаткове фукозилювання призводило до того, що $\alpha 7$ nAХР у мітохондріях мишей, що вживали нікотин, зв'язували PNU-282987 менш ефективно, у порівнянні з мітохондріями контрольних мишей. Аналогічно, додаткові залишки вуглеводів можуть запобігати конформаційним рухам пентамера під впливом позитивних алостеричних модуляторів PNU-120596 і dFBr. Однак не можна виключати можливість того, що пост-трансляційні модифікації nAХР під дією нікотину, що в кінцевому рахунку збільшують кількість рецептора на мітохондріях, є захисним механізмом проти постійної присутності агоністів для зменшення надмірної активації рецептора.

Субтип $\alpha 4\beta 2$ nAChR є найбільш чутливим до нікотину серед інших субтипів [185]. Наші результати показують, що нікотин чинив найбільш виражений ефект саме на вміст $\alpha 4\beta 2$ nAChR у мітохондріях. Ми спостерігали загальний перерозподіл всього клітинного пулу nAChR на користь мітохондрій в печінці мишей, що вживали нікотин. Ці дані свідчать про те, що нікотин сприяє направленню новосинтезованих nAChR саме до мітохондрій.

Нікотин впливає на активність дихального ланцюга та утворення супероксид іонів [190] в мітохондріях у nAChR-незалежний спосіб. Виявлення мітохондрійних nAChR [3] дозволило пояснити ефект нікотину на вивільнення Цит С [191] на ранніх стадіях мітохондрійного шляху апоптозу. Отримані нами результати показують, що вживання нікотину *in vivo* сприяє направленню nAChR до мітохондрій, але запобігає правильному функціонуванню новосинтезованих nAChR. Тому нікотин, як агоніст, може стимулювати мітохондрійні nAChR для підтримки життєздатності клітин, але його постійна присутність може дезактивувати нікотинові рецептори, послаблюючи холінергічний антиапоптотичний шлях.

Роботи, в яких опубліковані основні наукові результати розділу

Статті:

✓ Skok M, Gergalova G, Lykhmus O, Kalashnyk O, Koval L, **Uspenska K**. Nicotinic acetylcholine receptors in mitochondria : subunit composition, function and signaling. Neurotransmitter, 2016, Vol.3: e1290.

✓ **Uspenska K**, Lykhmus O, Gergalova G, Chernyshov V, Arias HR, Komisarenko S., Skok M. Nicotine facilitates nicotinic acetylcholine receptor targeting to mitochondria but makes them less susceptible to selective ligands. Neurosci Lett., 2017, Vol.656, p.43-50.

Тези:

○ **K. Uspenska**, O. Lykhmus, H. R. Arias, U. Maskos, M. V. Skok. Nicotinic acetylcholine receptors in mitochondria: structure, origin, mode of functioning. 41st FEBS Congress. The FEBS Journal, 2016, Vol. 283 (Suppl. 1), p. 434

- **K. Uspenska, O. Lykhmus, M. Skok.** Nicotine facilitates nicotinic acetylcholine receptor targeting to mitochondria but makes them less susceptible to specific ligands. 42nd FEBS Congress. The FEBS Journal, 2017, Vol. 284 (Suppl. 1), p. 151

3.2. Механізми сигналювання nAChR у мітохондріях

Раніше у нашій лабораторії було показано, що nAChR $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 4\beta 2$ та $\alpha 7\beta 2^*$ субтипів, присутні на зовнішній мембрані мітохондрій, залучені до регуляції мітохондрійного шляху апоптозу за рахунок регуляції внутрішньомітохондрійних кіназ. На відміну від nAChR плазматичної мембрани, сигналювання nAChR у мітохондріях не пов'язане з відкриттям іонного каналу, а, вірогідно, може бути ініційоване конформаційними змінами у молекулі рецептора. Тому одним із завдань нашої роботи стало з'ясування, зв'язування яких сайтів мітохондрійних nAChR є необхідним для індукції їх сигналювання. З цією метою було використано панель алостеричних модуляторів, зв'язування яких змінює конформацію nAChR, не відкриваючи іонний канал.

3.2.1. Механізм сигналювання $\alpha 7\beta 2^*$ nAChR у мітохондріях

Алостеричні модулятори – це сполуки, що зв'язуються з рецептором у сайті, відмінному від сайту зв'язування ортостеричного ліганду, та посилюють або послаблюють дію агоністів. Раніше було показано, що ПАМ II типу PNU-120596 не посилює ефект $\alpha 7$ -селективного агоністу PNU-282987 на вивільнення Цит С з мітохондрій під дією $0,9 \text{ мкМ Ca}^{2+}$ [4]. Як показано у Розділі 3.1.2, PNU-120596 ефективно та дозозалежно пригнічує Ca^{2+} -стимульоване вивільнення Цит С за відсутності агоніста (Рис. 3.6, В), тобто конформаційні зміни, викликані його зв'язуванням, є достатніми для стимуляції внутрішньомітохондрійного сигналювання nAChR.

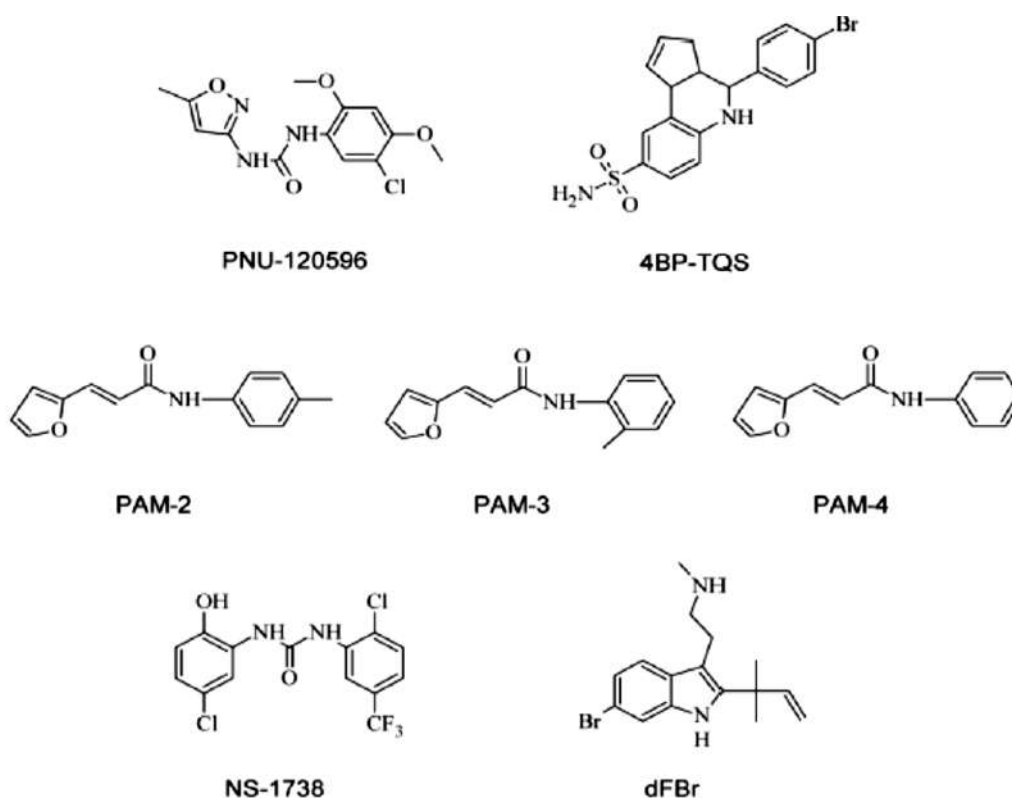


Рис. 3.7. Молекулярна будова алостеричних позитивних модуляторів.

У розвиток цього спостереження, ми порівняли вплив різних $\alpha 7$ -селективних лігандів, включаючи агоніст-подібний алостеричний модулятор 4BP-TQS, а також позитивні алостеричні модулятори (ПАМи) I типу (NS-1738) та II типу (PNU-120596 та PAM 2–4) (молекулярна структура представлена на Рис. 3.7) на мітохондрії печінки мишей дикого типу та $\alpha 7^{-/-}$ -мишей у присутності або відсутності PNU-282987.

PNU-120596 та 4BP-TQS ефективно пригнічували вивільнення Цит С з мітохондрій мишей дикого типу, але не з мітохондрій $\alpha 7^{-/-}$ -мишей (Рис. 3.8, А-Г), а NS-1738 не впливав на виділення Цит С з жодного із препаратів мітохондрій (Рис. 3.8, Д-Е). На відміну від PNU-120596 та 4BP-TQS, що не впливали на ефект PNU282987, NS-1738 у концентрації 1,0 або 10 мкМ запобігав ефекту PNU282987 на мітохондрії мишей дикого типу. Максимальне інгібування під дією PNU-120596 та 4BP-TQS становило $\sim 90\%$ від ефекту PNU282987, при цьому величина IC_{50} для 4BP-TQS була вдвічі нижчою, ніж для

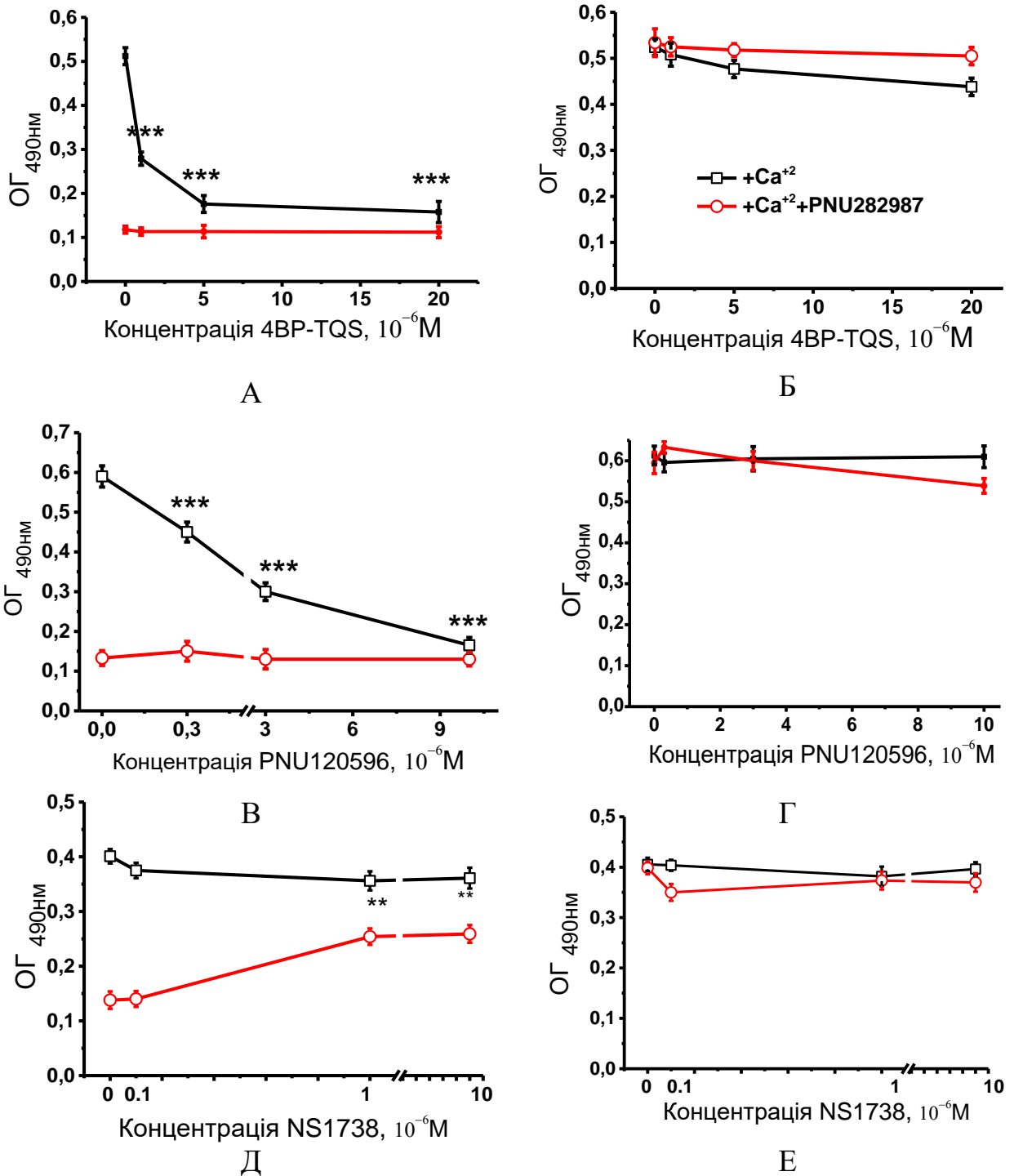


Рис. 3.8. Вивільнення Цит С з мітохондрій печінки мишей дикої типу (А, В, Д) та $\alpha 7^{-/-}$ нокаутних мишей (Б, Г, Е) у присутності $\alpha 7$ -специфічних позитивних алостеричних модуляторів під дією Ca^{2+} у присутності або відсутності PNU282987. $n = 5$ для кожної групи; ** - $p < 0.005$, *** - $p < 0.0005$ порівняно з контролем.

PNU-120596 (Табл. 3.1) [192]. Ці результати свідчать про те, що ефект, викликаний PNU-120596 і 4BP-TQS, опосередкований мітохондрійними $\alpha 7^*$ nAHP і що конформаційні зміни, викликані $\alpha 7$ -селективним ПАМом I типу (таким як NS-1738), відрізняються від тих, що викликані ПАМом II типу (таким як PNU-120596).

В наступних експериментах було порівняно ефект декількох $\alpha 7$ -специфічних ПАМів II типу, що володіють різними фармакологічними властивостями: PNU-120596 та РАМ-2, РАМ-3 і РАМ-4 [193], [186], [194]. РАМ-2, РАМ-3 та РАМ-4 пригнічували виділення Цит С з мітохондрій мишей дикого типу, але не $\alpha 7^{-/-}$ мишей (Рис. 3.9), що підтверджує їх специфічність до $\alpha 7^*$ nAHP. РАМ-2 виявився більш ефективним, ніж РАМ-3 та РАМ-4 (Табл. 3.1). Цікаво, що РАМ-2, при низьких концентраціях (0,1 мкМ і 0,3 мкМ), запобігав інгібуючому ефекту PNU282987, а при вищих (2,0 мкМ і 5,0 мкМ) – посилював ефект агоніста (Рис. 3.9, А). Ці результати свідчать про те, що при низьких концентраціях ПАМ-2 перешкоджає зв'язуванню агоніста з рецептором (можливо, за алостеричним механізмом), а при вищих – його ефективність як ПАМу (посилення ефекту ортостеричного агоністу) значно зростає [192].

Таблиця 3.1.

Пригнічення вивільнення Цит С з мітохондрій печінки під дією $\alpha 7$ -специфічних позитивних алостеричних модуляторів.

ПАМ	Пригнічення (IC ₅₀ ±SD) (мкМ)	Максимальна використана концентрація (мкМ)	% пригнічення (відносно 30нМ PNU282987)
4BP-TQS	0,79±0,14	20	90
PNU-120596	1,83±0,17	10	93
NS-1738	Ефекту не спостерігалось	10	15
PAM-2	1,01±0,25	5,0	90
PAM-3	6,25±0,32	25	70
PAM-4	7,32±0,27	25	70

PNU282987 (N-[(3R)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил]-4-хлоро-бензамід) є потужним $\alpha 7$ -специфічним агоністом (EC₅₀ = 150 нМ) [195]. Цей агоніст зв'язується з добре охарактеризованими ортостеричними ділянками, розташованими в N-кінцевому позаклітинному домені кожної $\alpha 7$ субодиниці, близької до Цис-петлі, що є структурною особливістю всіх рецепторів, що належать до цієї родини [196], [197]. Як і інші агоністи, PNU282987, зв'язуючись з нейрональними $\alpha 7$ nAХР, викликає такі конформаційні зміни молекули пентамера, що приводять до відкриття каналу та потоку катіонів, а згодом і десенсибілізації рецептора.

PNU-120596 - це ПАМ II типу з високою селективністю до $\alpha 7$ nAХР (EC₅₀ = 200 нМ) [198]. PNU-120596 зв'язується з сайтом (топографічно відмінним від ортостеричного), що розташований в межах однієї субодиниці, у її трансмембранній частині, утвореній залишками доменів M1-M4. У цьому сайті також може приєднуватися PAM-2, але не NS-1738 [193], [199]. У гомомерному $\alpha 7$ nAХР є 5 сайтів зв'язування PNU-120596, що забезпечує ефективне потенціонування рецептора за рахунок кооперативної модифікації

[200]. У нашому дослідженні PNU-120596 сильно пригнічував вивільнення Цит С з мітохондрій під дією Ca^{2+} у відсутності будь-якого агоніста, але не впливав на інгібуючий ефект PNU282987. Ці дані вказують на те, що в сигналювання мітохондрійних nAHP не залучені ні агоніст-індукований потік іонів, ні процес десенсибілізації рецептора. Саме певні конформаційні зміни рецептора, викликані лігандом, є ключовими для виникнення сигналювання nAHP у присутності PNU-120596.

РАМ-2, РАМ-3 та РАМ-4 - це високо $\alpha 7$ -специфічні ПАМи, що потенціюють нейрональні $\alpha 7$ nAHP ($EC_{50} \sim 5$ мкМ для РАМ-2 і РАМ-4; ~ 25 мкМ для РАМ-3). Функціональні дослідження показали, що хоча РАМ-2-4 вважаються РАМами II типу, вони менш потужні, ніж PNU-120596 [193], [186]. У нашому дослідженні максимальне пригнічення вивільнення Цит С, викликаного РАМ-2, було подібним до результатів, отриманих за допомогою PNU-120596 або 4BP-TQS, і концентрація пригнічення 50% від максимального для РАМ-2 ($IC_{50} \sim 1$ мкМ) була в тому ж діапазоні, як і для PNU-120596 (1,8 мкМ) або 4BP-TQS (0,8 мкМ), тоді як ефект РАМ-3 та РАМ-4 був відносно меншим [192]. Отримані нами дані щодо різниці між РАМ-2 і РАМ-3 узгоджуються з результатами Arias et al. [186], одержаними на культурі клітин, що експресують $\alpha 7$ nAHP, де РАМ-2 характеризувався більшою потенціюючою активністю, ніж РАМ-3. Проте це не пояснює різницю між активністю РАМ-2 і РАМ-4 [186].

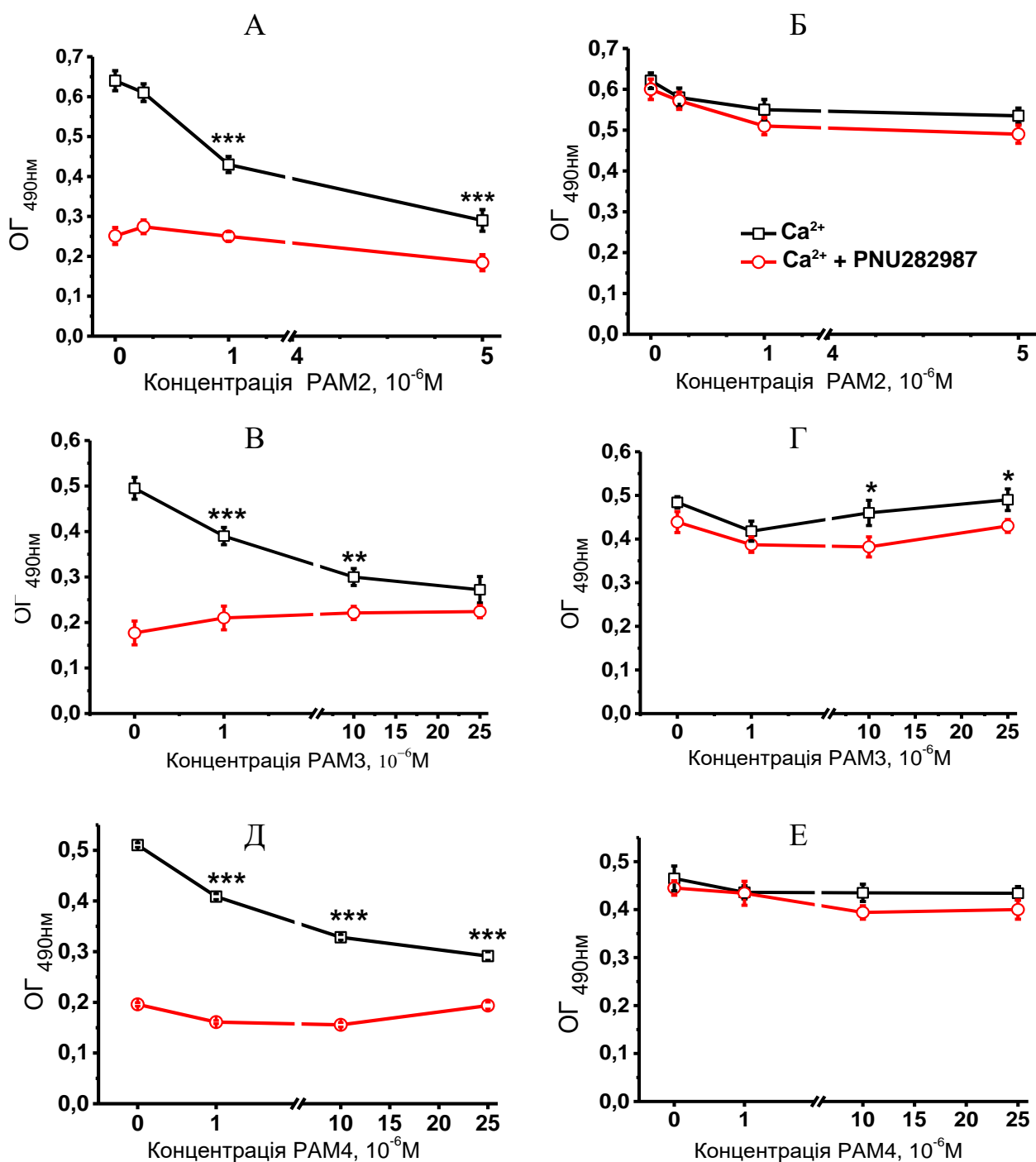


Рис. 3.9. Вивільнення Цит С з мітохондрій печінки мишей дикого типу (А, В, Д) та $\alpha 7^{-/-}$ нокаутних мишей (Б, Г, Е) у присутності $\alpha 7$ -специфічних позитивних алостеричних модуляторів під дією Ca^{2+} у присутності або відсутності PNU282987 ($n = 5$ для кожної групи); * - $p < 0.05$ ** - $p < 0.005$, *** - $p < 0.0005$ порівняно з контролем.

Можливо, різницю у активності цих сполук можна пояснити відмінностями у молекулярній структурі (наприклад, PAM-2 має *p*-метильну

групу у фенільному фрагменті, тоді як у РАМ-4 ця група відсутня, див. Рис.3.7). Також різниця фармакокінетичних параметрів цих сполук може бути пов'язана з тим, що ліпофільність РАМ-2 є відносно вищою ($\text{LogP} = 2,99$), ніж у РАМ-4 ($\text{LogP} = 2,55$) [186]. Згідно з функціональними та структурними експериментами, сайт для зв'язування цих ПАМів такий самий, як і для РNU-120596 [193], [199].

Отже, отримані нами у експерименті з РАМ-2, РАМ-3 та РАМ-4 дані підтверджують гіпотезу про те, що конформаційні зміни $\alpha 7$ нАХР, викликані зв'язуванням ПАМів II типу з сайтом, розташованим в межах однієї субодиниці, достатні для індукції внутрішньомітохондрійного сигналювання. Крім того, за результатами молекулярного докінг-аналізу [199], вірогідно, що ці «ключові» для сигналювання мітохондрійних нАХР сайти для РАМ-2 та РNU-120596 розташовані в субодиниці в межах ділянки з'єднання позаклітинного та трансмембранного доменів рецептора. А так як ці сайти знаходяться в домені, що регулює процес відкриття каналу рецептора [197], це пояснює вплив РАМ-2 на інгібуючий ефект РNU-282987.

4BP-TQS (4-(4-бромфеніл)-3a,4,5,9b-тетрагідро-3H-циклопента[c]хінолін-8-сульфонамід) є одночасно алостеричним агоністом і ПАМом II типу, специфічним до $\alpha 7$ нАХР, так званим агоніст-подібним ПАМом [201]. Іншими словами, у присутності агоністів він потенціює $\alpha 7$ нАХР у нейронах, тоді як за відсутності агоністів він може сам по собі активувати рецептор з більш високою ефективністю, ніж ацетилхолін, не викликаючи при цьому десенситизації рецептора. 4BP-TQS зв'язується у тому ж місці зв'язування, що і РNU-120956 та РАМ-2 [201], [199]. Згідно з нашими результатами, 4BP-TQS у концентрації 20 мкМ знижує вивільнення Цит С з мітохондрій на 90% у порівнянні з 30 нМ РNU282987. Таким чином, конформаційні зміни $\alpha 7$ нАХР, необхідні для внутрішньомітохондрійного сигналіngu, можуть викликати ліганди, які зв'язуються як з позаклітинним (ортостеричним) (РNU282987), так і з трансмембранним (в межах однієї субодиниці) (ПАМ II типу) сайтом.

NS-1738 є $\alpha 7$ -специфічним ПАМом I типу, що посилює ефект агоністів у нейронах, практично не впливаючи на кінетику десенситизації рецепторів [202], [186]. Експериментальні дані підтверджують розташування сайту зв'язування NS-1738 та інших ПАМів I типу у позаклітинному домені $\alpha 7$ nAChR [202], [193,199]. На моделі химери $\alpha 7$ /AChBP [203], а також методом молекулярного докінг-аналізу [199] було показано, що NS-1738 взаємодіє з трьома ділянками позаклітинного домену. За результатами наших експериментів, NS-1738 не пригнічував вивільнення Цит С з мітохондрій, але запобігав інгібуючому ефекту, спричиненому PNU-282987. Ці результати вказують на те, що, хоча зв'язування NS-1738 може знизити ефект агоністу, ймовірно, через невідомий алостеричний механізм, супутні конформаційні зміни $\alpha 7$ nAChR недостатні для активації внутрішньомітохондрійного сигналювання.

Отримані результати показують, що конформаційні зміни у структурі молекули $\alpha 7$ nAChR, що є необхідними для індукування внутрішньомітохондрійного сигналювання, можуть бути викликані зв'язуванням агоністів або конкурентних антагоністів у ортостеричному сайті або зв'язуванням ПАМів II типу у сайті, розташованому у трансмембранній частині субодиниці (Рис. 3.10). ПАМи I типу, що зв'язуються у позаклітинній частині субодиниці, не впливають на внутрішньомітохондрійне сигналювання $\alpha 7$ nAChR (Рис. 3.10). Більш того, ці конформаційні зміни можуть впливати на внутрішньомітохондрійну частину субодиниці рецептора, але не залучає ні потоку іонів через канал, ні механізм десенситизації [192].

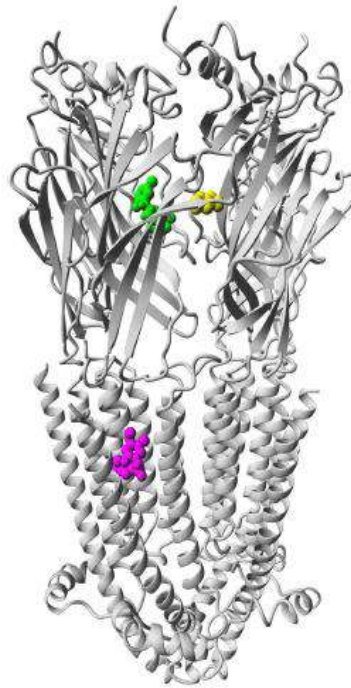


Рис. 3.10. Молекулярний докінг-аналіз сайтів зв'язування позитивних алостеричних модуляторів з $\alpha 7$ субодиницею nAChR.

Зеленим позначений сайт зв'язування NS-1738, фіолетовим - PNU-120956, 4BP-TQS, PAM-2-4, жовтим – ортостеричний сайт зв'язування агоністів [199].

Відомо, що різні апоптогенні фактори впливають на різні внутрішньомітохондрійні шляхи сигналювання: Ca^{2+} стимулює CaKMP-залежний шлях, H_2O_2 діє через Src-залежний шлях, а вортманін інгібує PI_3 -кіназу, результатом чого є відкриття мітохондрійної пори і вивільнення Цит С [4]. Щоб з'ясувати, який сигнальний шлях є найбільш чутливим до дії $\alpha 7$ -специфічних ПАМів, ми дослідили вплив PNU-120596 на вивільнення Цит С з мітохондрій печінки мишей дикого типу під дією Ca^{2+} , H_2O_2 або вортманіну [192]. Як показано на Рис.3.11, 10 мкМ PNU-120596 найсильніше (на 65%) пригнічував вивільнення Цит С за дії Ca^{2+} , в той час як пригнічення H_2O_2 - або вортманін-стимульованого вивільнення Цит С було значно нижчим (на 40% та ~13% відповідно). Таким чином, PNU-120596 переважно впливав на CaKMP-залежний шлях сигналювання в мітохондріях.

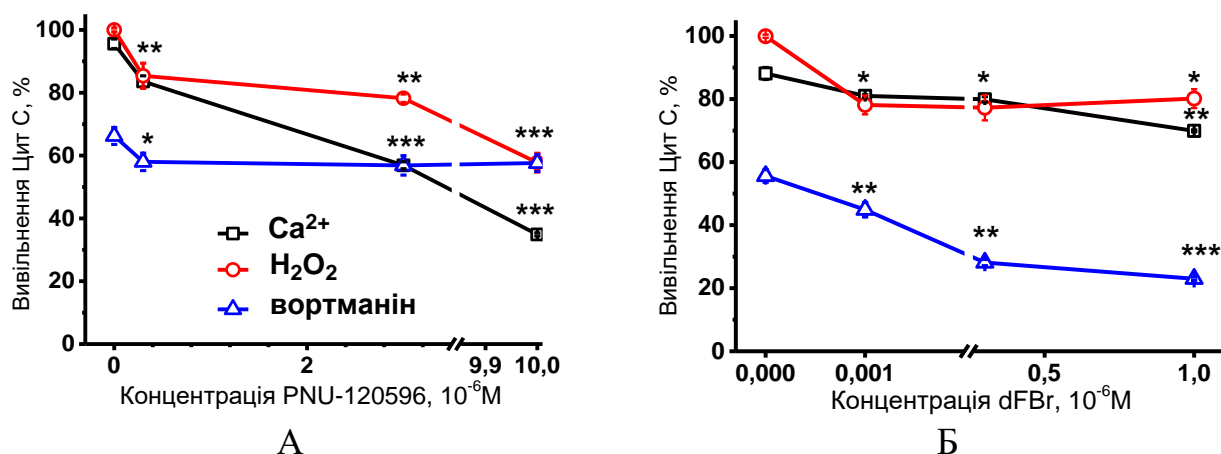


Рис. 3.11. Вивільнення Цит С з мітохондрій печінки мишей дикого типу у присутності PNU120596 (А) та dFBr (В) під дією Ca^{2+} , H_2O_2 та вортманіну. * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.005$, *** - $p < 0.0005$ порівняно з даними без додавання PNU120596 або dFBr.

На відміну $\beta 2$ -специфічний ПАМ другого типу, dFBr [187], був ефективним переважно проти вортманіну (57% інгібування) та набагато менш ефективним проти Ca^{2+} або H_2O_2 (~ 20% інгібування) у мітохондріях мишей дикого типу (Рис. 3.11). Це вказує на те, що dFBr впливав переважно на PI_3 -кіназний шлях сигналювання.

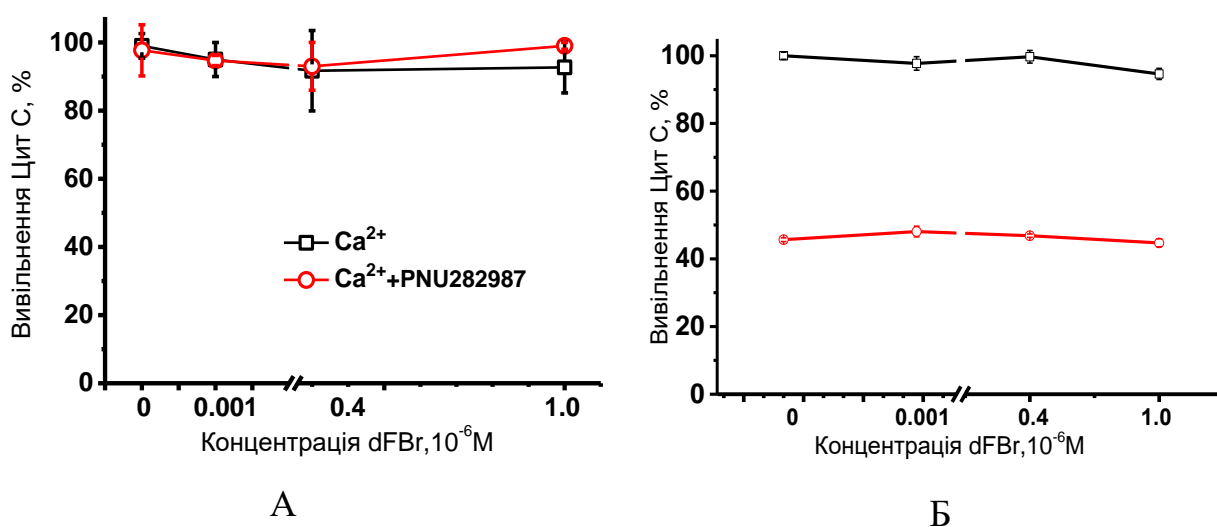


Рис. 3.12. Вплив dFBr на вивільнення Цит С під дією Ca^{2+} за присутності чи відсутності PNU282987 з мітохондрій печінки $\alpha 7^{-/-}$ (А) та $\beta 2^{-/-}$ (Б) мишей.

Подібно до дії ПАМ-2, низька концентрація dFBr (0,001 мкМ) попереджала інгібуючий ефект на вивільнення Цит С 1,0 мкМ Dh β E, конкурентного антагоніста з високою селективністю до $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$ та $\alpha 2\beta 2$ (тобто, β -вмісних НАХР), в той час як ефект Dh β E посилювався при його вищих концентраціях (0,3 мкМ та 1,0 мкМ) у $\alpha 7$ -/- мітохондріях (Рис. 3.13).

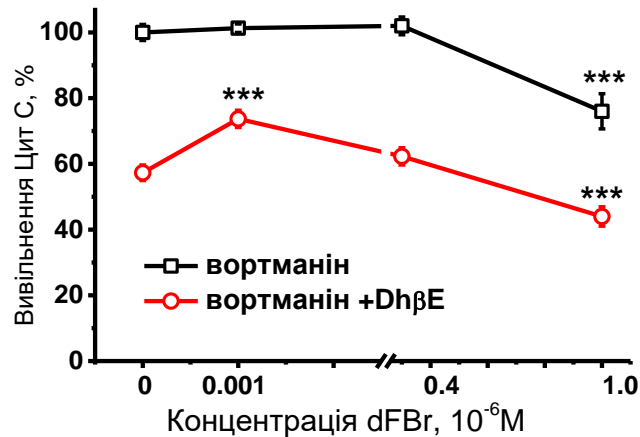


Рис. 3.13. Вплив Dh β E на вивільнення Цит С з мітохондрій печінки мишей дикого типу у присутності dFBr під дією вортманіну. *** - $p < 0.0005$ порівняно з даними без додавання dFBr.

Цікаво, що dFBr був менш ефективним проти вивільнення Цит С з мітохондрій печінки $\alpha 7$ -/- мишей під дією вортманіну та взагалі не впливав на Ca^{2+} -індуковане вивільнення Цит С із мітохондрій $\alpha 7$ -/- (Рис. 3.12, А), та $\beta 2$ -/- мишей (Рис. 3.13, Б). Ці дані є додатковим свідченням того, що мітохондрійні $\alpha 7$ -вмісні НАХР представлені у складі гетеромерів $\alpha 7\beta 2$ [161]. Зниження рівню $\beta 2$ субодиниць НАХР у мітохондріях $\alpha 7$ -/- мишей також може бути непрямим підтвердженням того, що мітохондрії мишей дикого типу містять $\alpha 7\beta 2$ гетеромерний НАХР.

dFBr є ПАМом II типу з селективністю до $\alpha 4\beta 2$ та $\alpha 2\beta 2$ НАХР при низьких концентраціях, що також пригнічує $\alpha 7$ НАХР в концентраціях > 1 мкМ [187], [204]. Точний сайт зв'язування dFBr з рецептором обговорюється. Використання мутантних форм $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ та $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ НАХР дозволило

припустити, що сайт зв'язування dFBr включає амінокислоти в межах позаклітинної області $\beta 2$ субодиниці, розташованій між $\beta 2$ та $\alpha 4$ субодиницями [205]. Інші дослідження показали, що dFBr взаємодіє переважно з ділянкою, розташованою між двома $\alpha 4$ субодиницями [206]. У нашому експерименті dFBr у дуже низькій концентрації (0,001 мкМ) пригнічував вивільнення Цит С з мітохондрій під дією вортманіну, вказуючи на залучення мітохондрійних $\beta 2$ -вмісних nАХР до внутрішньомітохондрійного PI_3 -кіназного шляху сигналювання. Ще одним підтвердженням залучення $\beta 2$ -вмісних nАХР є той факт, що низькі концентрації dFBr попереджали інгібіторний ефект Dh β E. Також те, що 1,0 мкМ dFBr пригнічував Ca^{2+} -стимульоване вивільнення Цит С з мітохондрій мишей дикого типу, але не з мітохондрій $\beta 2$ -/- мишей, підтверджує участь $\beta 2$ субодиниць nАХР у цьому процесі. Проте, оскільки $\alpha 7$ -специфічні ПАМи в основному впливали на Ca^{2+} -стимульовану СаКМП-кіназу, ці дані також можуть свідчити про залучення $\alpha 7^*$ nАХР.

В цілому, отримані дані дозволяють припустити, що ефекти dFBr на мітохондрії, крім $\alpha 4\beta 2$ nАХР, можуть включати підтип $\alpha 7\beta 2$: при низьких концентраціях dFBr впливає на $\alpha 4\beta 2$ та/або $\alpha 7\beta 2$ субтипи (відповідно приливаючи на PI_3 -кіназний залежний шлях), а при вищих концентраціях він також впливає на $\alpha 7$ субодиниці у складі $\alpha 7$ та/або $\alpha 7\beta 2$ субтипах (активуючи СаКМП-залежний шлях сигналювання).

Відповідно, $\alpha 7$ та $\beta 2$ субодиниці можуть бути пов'язаними з двома різними (тобто СаКМП- і PI_3 К-залежними) внутрішньомітохондрійними сигнальними шляхами. Тому ефективна стимуляція гетеромерних $\alpha 7\beta 2$ nАХР (наприклад, комбінацією $\alpha 7$ - і $\beta 2$ -специфічних ПАМів) запускає обидва шляхи. Ця ідея узгоджується з тим, що високо ефективні ліганди $\alpha 7$ та $\alpha 7\beta 2$ nАХР, агоніст PNU282987 (30 нМ) та конкурентний антагоніст метиллікаконітин (MLA, 50 нМ), впливали на PI_3 К/Akt сигнальний шлях [4,161]. При цьому, зважаючи на те, що ці ліганди викликають різні зміни у конформації рецептора (тобто, MLA стабілізує переважно стан спокою, а PNU282987 стабілізує рецептор у відкритому стані [197], [207]), можна зробити висновок, що ця

різниця не є критичною для активації PI_3K/Akt внутрішньомітохондрійного шляху.

3.2.2. Механізм сигналювання $\alpha\beta_4^*$ nAHP у мітохондріях

Для з'ясування механізму сигналювання $\alpha\beta_4^*$ мітохондрійних nAHP ми дослідили вплив (\pm)-18-метоксикоронаридину ((\pm)-18-methoxycoronaridine, (\pm)-18-МС) та (+)-катарантину ((+)-catharanthine), на вивільнення Цит С із ізольованих мітохондрій за дії апоптогенних чинників різної природи – Ca^{2+} або H_2O_2 [208].

(\pm)-18-МС та (+)-катарантин є похідними коронаридину (Рис. 3.14) і використовуються у фармакології як неконкурентні агоністи нейрональних субтипів nAHP з переважною вибірковістю до $\alpha\beta_4$ субтипу nAHP [209], [210], [211]. У мозку $\alpha\beta_4$ субтип nAHP експресується переважно у нейронах холінергічного шляху, що зв'язує ділянки мозку habenula та interpeduncula, тому похідні коронаридину досліджують як лікарські засоби для лікування різних видів залежності.

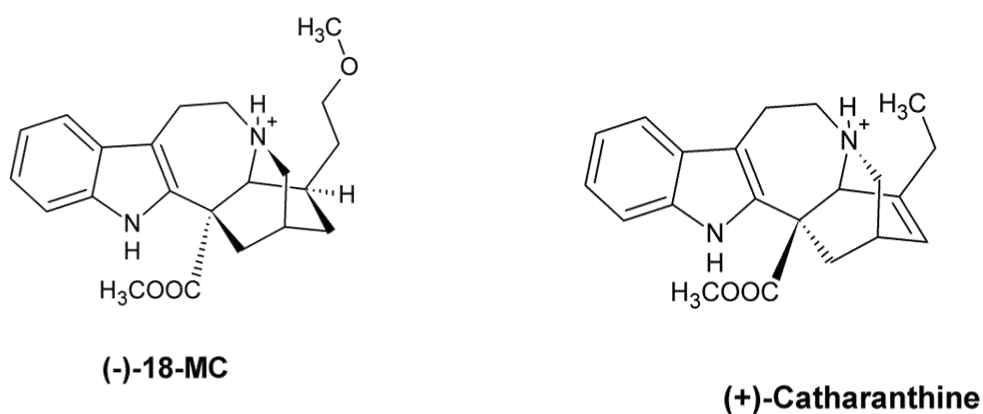


Рис. 3.14. Молекулярна структура неконкурентних антагоністів $\alpha\beta_4$ субтипу nAHP.

За нашими даними, рівень β_4 субодиниць nAHP був незначним в мітохондріях мишей дикого типу і значно підвищувався за відсутності

$\alpha 7$ -вмісних нАХР (Рис. 3.20). Тому перш за все ми порівняли рівень $\alpha 3\beta 4$ нАХР в мітохондріях печінки та мозку мишей дикого типу та нокаутуваних за генами $\alpha 3$, $\alpha 7$ або $\beta 4$ субодиниць нАХР. Для цього був використаний метод Сендвіч-ІФА, в якому нАХР захоплювали антитілами проти $\alpha 3$ субодиниці, а виявляли антитілами проти $\beta 4$ субодиниці.

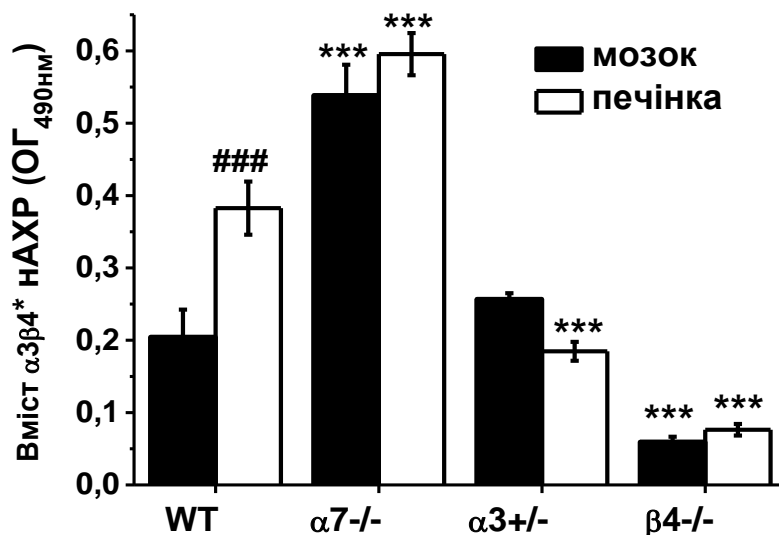


Рис. 3.15. Вміст $\alpha 3\beta 4^*$ нАХР у мітохондріях мозку (чорний) та печінки (білий) мишей дикого типу та нокаутуваних за генами $\alpha 7$, $\alpha 3$ та $\beta 4$ субодиниць нАХР. *** - $p < .0005$, у порівнянні з мітохондріями мишей дикого типу; ### - $p < .0005$, у порівнянні з мітохондріями мозку мишей дикого типу.

Було виявлено, що рівень $\alpha 3\beta 4$ субтипу нАХР є вищим у мітохондріях печінки порівняно з мозком мишей дикого типу і значно зростає в мітохондріях як мозку, так і печінки $\alpha 7^{-/-}$ мишей (Рис. 3.15). Ці дані вказують на компенсаторний механізм, що присутній у мітохондріях $\alpha 7^{-/-}$ мишей, та відповідають даним *Yu et al.* про те, що у гіпокампі та корі мозку $\alpha 7^{-/-}$ мишей, підвищується рівень $\alpha 3$ та $\beta 4$ субодиниць нАХР [212].

Після цього ми порівняли вплив (\pm)-18-МС та (+)-катарантину на стійкість мітохондрій мозку та печінки мишей дикого типу та $\alpha 7^{-/-}$ до дії Ca^{2+}

та H₂O₂. За отриманими результатами було обраховано IC₅₀, представлені у Таблиці 3.2.

Таблиця 3.2. Фармакологічна активність похідних коронаридину на мітохондрійні $\alpha\beta\gamma\delta^*$ нАХР.

Миші	Мітохондрії	Похідні коронаридину	IC ₅₀ (мкМ) ^a	
			Апоптогенний чинник	
			Ca ²⁺	H ₂ O ₂
Дикий тип	Печінка	(±)-18-МС	4,6 ± 0,4	2,4 ± 0,2
		(+)-катарантин	25,0 ± 1,0	29,3 ± 5,5
	Мозок	(±)-18-МС	Не було ефекту	2,0 ± 0,2
$\alpha\gamma\delta^-$	Печінка	(±)-18-МС	3,1 ± 0,9	4,2 ± 0,3
		(+)-катарантин	25,0 ± 1,0	23,7 ± 1,5
	Мозок	(±)-18-МС	2,9 ± 0,6	>>5

Результати показали, що (±)-18-МС у концентрації 1-5 мМ ефективно знижував вивільнення Цит С з мітохондрій печінки мишей дикого типу (Рис. 3.16, А). Ефект був виражений головним чином проти H₂O₂ (60% інгібування; IC₅₀ = 2,4±0,2 мМ) і відносно менше проти Ca²⁺ (50% інгібування, IC₅₀ = 4,6±0,4 мМ). Отримані дані були проаналізовані у статистичному тесті one-way ANOVA; різниця була достовірною (F < 0,05; Таблиця 3.3). Набагато менший ефект (±)-18-МС (20% інгібування, IC₅₀ = 2,0±0,2 мМ) спостерігався проти H₂O₂ у мітохондріях головного мозку мишей дикого типу (що відповідало нижчому рівню $\alpha\beta\gamma\delta$ нАХР в мозку порівняно з печінкою). При цьому (±)-18-МС не впливав на вивільнення Цит С під дією Ca²⁺ (Рис. 3.16, В). На відміну, мітохондрії $\alpha\gamma\delta^-$ мишей, ізольовані як із печінки (Рис. 3.16, Б), так і

із мозку (Рис. 3.16, Г) були чутливими до (\pm)-18-МС, причому більше під дією Ca^{2+} , ніж H_2O_2 .

Таблиця 3.3.

Статистична різниця між ефектами різних концентрацій (\pm)-18-МС на вивільнення Цит С під дією Ca^{2+} або H_2O_2 з мітохондрій мозку та печінки мишей дикого типу або $\alpha 7^{-/-}$ нокаутних мишей. Значення F (статистичний тест one-way ANOVA) ≤ 0.05 вважали статистично достовірною різницею, значення >0.05 вважали статистично недостовірною (Н/Д).

Миші	Мітохондрії	Концентрація (\pm)-18-МС		
		1.5 мкМ	2.5 мкМ	5.0 мкМ
		Значення F		
Дикий тип	Печінка	3.6×10^{-4}	1.9×10^{-6}	0.027
	Мозок	0.013	1.8×10^{-5}	4.1×10^{-3}
$\alpha 7^{-/-}$	Печінка	0.025	0.089 (Н/Д)	0.544 (Н/Д)
	Мозок	7.7×10^{-6}	7.1×10^{-4}	1.2×10^{-3}

(+)-Катарантин був значно менш ефективним порівняно з (\pm)-18-МС. Крім того, у концентрації 1-5 мМ він ефективніше впливав на вивільнення Цит С під дією Ca^{2+} , ніж під дією H_2O_2 з мітохондрій печінки мишей дикого типу (40% та 15% інгібування відповідно, Рис 3.17) і його ефект зберігався в мітохондріях печінки $\alpha 7^{-/-}$ мишей. Суттєвий ефект (+)-катарантину, аналогічний ефекту (\pm)-18-МС, спостерігався при підвищенні його концентрації до 50 мМ, що означає збільшення IC_{50} у 10 разів порівняно з (\pm)-18-МС (Табл. 3.2). Отримані дані були проаналізовані у статистичному тесті one-way ANOVA; різниця була достовірною ($F < 0,05$; Таблиця 3.4).

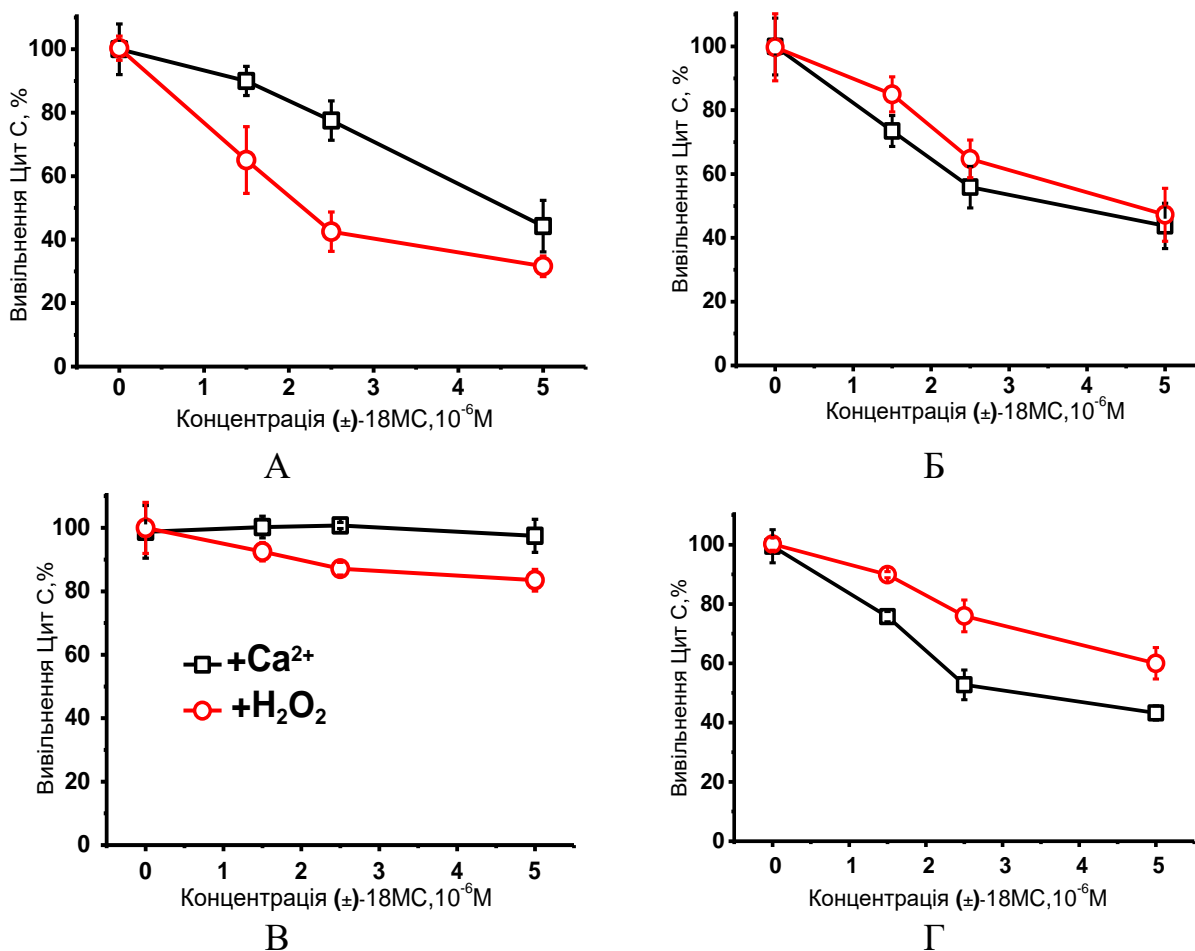


Рис. 3.16. Вивільнення Цит С з мітохондрій печінки (А, В) та мозку (Б, Г) мишей дикого типу (А, Б) та $\alpha 7^{-/-}$ нокаутних (В, Г) мишей у присутності (±)18-МС під дією Ca^{2+} або H_2O_2 .

Отримані дані вказують на те, що у тесті вивільнення Цит С (±)-18-МС є у 10 разів більш ефективним, ніж (+)-катарантин. Крім того, (±)-18-МС знижував вивільнення Цит С з мітохондрій $\alpha 7^{-/-}$ мишей більш ефективно, ніж із мітохондрій мишей дикого типу, що свідчило про його специфічність до $\alpha 3\beta 4^*$ субтипу nAХР. На відміну, (+)-катарантин практично не відрізняв мітохондрії мишей дикого типу і $\alpha 7^{-/-}$, що ставило під сумнів його селективність до $\alpha 3\beta 4^*$ субтипу nAХР.

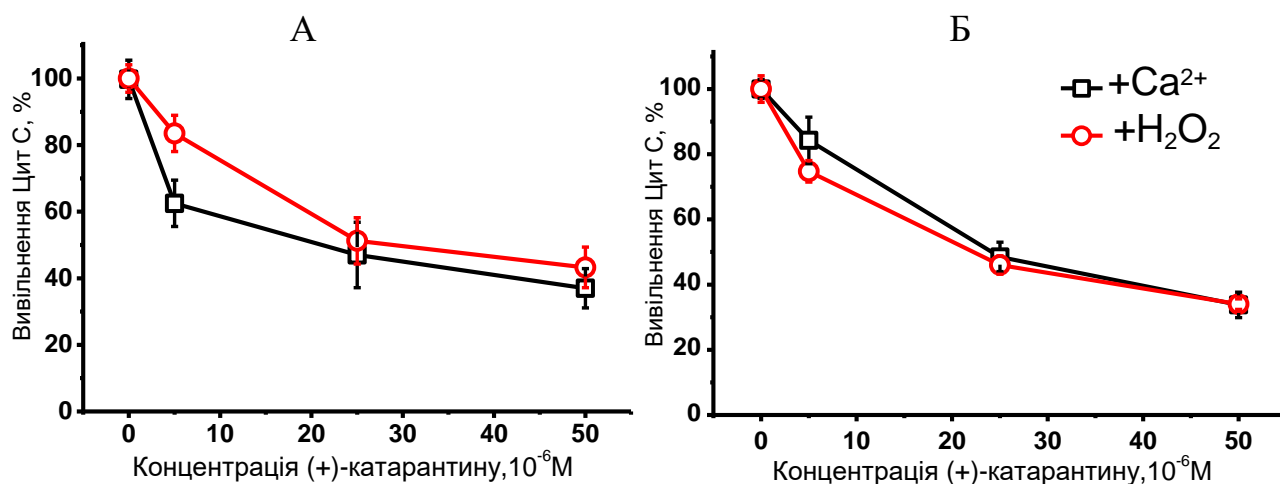


Рис. 3.17. Вивільнення Цит С з мітохондрій печінки мишей дикого типу (А) та $\alpha 7^{-/-}$ нокаутних (Б) мишей у присутності (+)-катарантин під дією Ca^{2+} або H_2O_2 .

Таблиця 3.4.

Статистична різниця між ефектами різних концентрацій (+)-катарантину на вивільнення Цит С під дією Ca^{2+} або H_2O_2 з мітохондрій печінки мишей дикого типу або $\alpha 7^{-/-}$ нокаутних мишей. Значення F (статистичний тест one-way ANOVA) ≤ 0.05 вважали статистично достовірною різницею, значення >0.05 вважали статистично недостовірною (Н/Д).

(+)-катарантин, мкМ	F значення	
	дикого типу	$\alpha 7^{-/-}$
5,0	2.7×10^{-4}	0.082 (Н/Д)
25,0	0.39 (Н/Д)	0.384 (Н/Д)
50,0	0.094 (Н/Д)	0.91(Н/Д)

Результати функціонального тесту також свідчать про відмінність внутрішньомітохондрійного сигналювання під дією (\pm)-18-МС та (+)-катарантину. Як вже згадувалось вище, Ca^{2+} стимулює вивільнення Цит С з мітохондрій за участю Ca^{2+} /кальмодулінзалежної протеїнкінази II (CaКМII), тоді як H_2O_2 впливає на прото-онкоген тирозин-протеїнкіназний (Src)-залежний шлях сигналювання [4]. Позитивні алостеричні модулятори (ПАМ), селективні до $\alpha 7$ НАХР (наприклад, PNU-120596), були ефективними переважно проти Ca^{2+} -стимулюваного вивільнення Цит С, тоді як агоністи $\alpha 3\beta 2$ і $\alpha 4\beta 2$ НАХР

(конотоксин МП та Dh β E, відповідно), були ефективними проти H₂O₂ [4]. Ці дані вказують на те, що, вочевидь, різні субодиниці nAХР пов'язані з різними сигнальними шляхами: $\alpha 7$ субодиниці регулюють СаКМП-залежний шлях сигналювання, а $\alpha 3$ та $\alpha 4$ субодиниці – Src-залежний шлях. Відповідно, фармакологічні ефекти нікотину, в тому числі нікотинова залежність, обумовлені стимуляцією нейрональних $\alpha 3\alpha 5\beta 4$ nAХР, які активують Src-залежний шлях сигналювання [213]. Отже, (\pm)-18-МС може впливати на шкідливі ефекти, викликані ніотином. Це підтверджується даними експеримента *Maisonneuve and Glick*, де (\pm)-18-МС знижував самостійне вживання нікотину гризунами [214]. У мітохондріях $\alpha 7$ -/- мишей (\pm)-18-МС також сильно впливав на СаКМП-залежний шлях сигналювання, що вказує на компенсаторний механізм, коли $\alpha 3\beta 4^*$ nAХР взяли на себе функції відсутніх $\alpha 7$ -вмісних nAХР. Таким чином, мітохондрійні nAХР можуть бути пов'язані з різними сигнальними шляхами, в залежності від особливостей фенотипу клітини.

На відміну від (\pm)-18-МС, (+)-катарантин в низьких концентраціях (5 М) був відносно більш ефективним щодо Са²⁺-індукованого вивільнення Цит С з мітохондрій печінки мишей дикого типу. При більш високих концентраціях (5-50 мМ) він впливав однаково на Са²⁺- та H₂O₂-стимульоване вивільнення Цит С з мітохондрій мишей і дикого типу, і $\alpha 7$ -/-. Оскільки (+)-катарантин при таких концентраціях здатний інгібувати $\alpha 4\beta 2$ (IC₅₀ = 12,6 \pm 1,8 мМ) та $\alpha 7$ nAХР (IC₅₀ = 21,8 \pm 2,5 мМ), можливо, що декілька субтипів nAХР залучені одночасно, впливаючи при цьому на різні внутрішньомітохондрійні шляхи.

За нашими даними, (\pm)-18-МС пригнічував вивільнення Цит С з мітохондрій у 10 разів ефективніше, ніж (+)-катарантин. Однак в інших експериментах (+)-катарантин у 2 рази інтенсивніше, ніж (\pm)-18-МС, пригнічував потік Са²⁺ через $\alpha 3\beta 4$ nAХР, експресовані у гетерологічних клітинах [215]. Ці дані показують, що структурні зміни у молекулі рецептора $\alpha 3\beta 4$ субтипу, необхідні для активації внутрішньомітохондрійних кіназ,

відрізняються від тих, що необхідні для пригнічення потоку іонів через канал. Ми припустили, що така різниця у ефектах (\pm)-18-МС та (+)-катарантину у різних експериментальних моделях може бути пов'язана з різницею їх молекулярної структури. Як зображено на Рис. 3.14, молекулярна будова цих двох речовин є досить подібною, але відрізняється заміщенням метильної групи бічного ланцюга (+)-катарантину на більш довгу оксиметильну групу у (\pm)-18-МС, що може призводити до перерозподілу електронної густини, впливаючи на молекулярну конфігурацію. У лабораторії проф. Х. Аріаса були досліджені фізико-хімічні параметри (\pm)-18-МС та (+)-катарантину. Ліпофільність (LogP), молекулярний об'єм, площа поверхні та молярна рефрактивність обох сполук були подібними, в той час як полярний об'єм, і таким чином, площа полярної поверхні, (\pm)-18-МС була вдвічі більшою, ніж (+)-катарантину [208]. Відомо, що полярність поверхні похідних коронаридину може визначати їх активність [215]. Більш того, моделювання зв'язування (\pm)-18-МС та (+)-катарантину з молекулою $\alpha 3\beta 4$ nAHR показали, що (\pm)-18-МС зв'язується з рецептором у місці (сайті), розташованому між $\alpha 3$ та $\beta 4$ субодинамиціями, а (+)-катарантин – у сайті між двома $\beta 4$ субодинамиціями. Відповідно, отримані нами дані показують, що (\pm)-18-МС та (+)-катарантин можуть викликати неоднакові конформаційні зміни у молекулі $\alpha 3\beta 4$ nAHR. Вірогідно, конформаційні зміни, викликані зв'язуванням ліганду у $\alpha 3/\beta 4$ -сайті, необхідні і достатні для активації внутрішньомітохондрійного Src-залежного шляху сигналювання, тоді як зв'язування у $\beta 4/\beta 4$ -сайті активує переважно CaKMP-залежний шлях.

Загалом, результати, описані в цьому підрозділі, дозволяють припустити, що різні підтипи nAHR, а саме внутрішньомітохондрійні домени кожної з субодинамиць, структурно та функціонально пов'язані з різними кіназами. Тому наявність декількох підтипів nAHR в мітохондріях забезпечує залучення найбільш важливих сигнальних шляхів, підтримуючи стійкість мітохондрій до апоптогенних чинників різної природи (екзогенних та

ендогенних). За відсутності однієї з субодиниць може існувати механізм компенсації, де функція сигналювання відсутньої субодиниці виконується іншою («компенсаторною») субодиницею. Так, за відсутності $\alpha 7\beta 2$ нАХР, підвищена експресія $\alpha 3\beta 4$ субтипу нАХР у мітохондріях компенсує регуляцію СаКМП-залежного шляху сигналювання.

Роботи, в яких опубліковані основні наукові результати розділу

Статті:

✓ **Uspenska K**, Lykhmus O, Arias HR, Pons S, Maskos U, Komisarenko S, Skok M. Positive allosteric modulators of $\alpha 7^*$ or $\beta 2^*$ nicotinic acetylcholine receptors trigger different kinase pathways in mitochondria. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2018, Vol. 9, p. 226–235.

✓ Arias HR, Lykhmus O, **Uspenska K**, Skok M. Coronaridine congeners modulate mitochondrial $\alpha 3\beta 4^*$ nicotinic acetylcholine receptors with different potency and through distinct intra-mitochondrial pathways. *Neurochemistry International*, 2018, Vol.114 p. 26-32.

Тези:

○ **Uspenska K**, Lykhmus O, Obolenska M, Maskos U, Skok M. Mitochondrial nicotinic acetylcholine receptors: physiological value and mechanism of functioning. Матеріали міжнр.конф. “*Nicotinic Acetylcholine Receptors 2017*”; 2017 Тра 7-11; Греція, Крит; 2017, с. S47.

○ **Успенська К.Р.**, Лихмус О.Ю. Субодиничний склад та функціонування нікотинових ацетилхолінових рецепторів у мітохондріях мишей нокаутних за генами $\alpha 3$, $\alpha 7$, $\beta 2$ або $\beta 4$ субодиниць. Матеріали конф.-конкурсу молодих учених «*Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016*»; 2016 Трав 26-27; Україна, Київ; 2016. с. 53.

○ **Uspenska K**, Lykhmus O, Skok M. Functioning and physiological role of nicotinic acetylcholine receptors in mitochondria. Матеріали міжнр. конф. «*Conference of Young Scientists*»; 2017 Чер 6-9; Україна, Київ. *Ukr.Biochem.J.* 2017, 89(3), с.111.

3.3. Біологічна роль nAHR мітохондрій

3.3.1. Відсутність $\alpha 3$, $\alpha 7$, $\beta 2$ та $\beta 4$ субодиниць nAHR не критично впливає на чутливість мітохондрій до дії Ca^{2+}

Відповідно до попередніх досліджень лабораторії, мітохондрійні nAHR відіграють важливу роль у апоптогенній стійкості мітохондрій до дії Ca^{2+} [3]. Проте не було відомо, які саме субтипи nAHR, що експресуються у клітині, відіграють найбільш значиму роль у функціонуванні рецептора на мітохондріях. Тому ми дослідили, як впливає відсутність певних субодиниць nAHR на чутливість мітохондрій до Ca^{2+} та лігандів, специфічних до різних субтипів nAHR [216].

З цією метою було протестовано мітохондрії печінки мишей, нокаутних за генами $\alpha 7$ [164], $\alpha 7$ та $\beta 2$, або $\beta 4$ субодиниць nAHR [217] ($\alpha 7^{-/-}$, $\alpha 7\beta 2^{-/-}$ та $\beta 4^{-/-}$ відповідно) та гетерозиготних $\alpha 3^{+/-}$ мишей (оскільки ембріони гомозиготних $\alpha 3^{-/-}$ мишей не виживають [166]).

Мітохондрії всіх нокаутних мишей вивільняли невелику кількість Цит С навіть без додавання Ca^{2+} . За низької дози Ca^{2+} (0,1 мкМ) мітохондрії $\alpha 7^{-/-}$, $\alpha 7\beta 2^{-/-}$ та $\alpha 3^{+/-}$ мишей вивільняли більше Цит С у порівнянні з мітохондріями мишей дикого типу (Рис. 3.18) При дозі Ca^{2+} 0,5 мкМ значна різниця у вивільненні Цит С спостерігалась тільки у мітохондріях $\alpha 7\beta 2^{-/-}$ мишей. А при додаванні Ca^{2+} у концентрації 0,9 мкМ мітохондрії $\alpha 7^{-/-}$ та $\alpha 7\beta 2^{-/-}$ мишей були навіть більш стійкими до дії Ca^{2+} , ніж мітохондрії мишей дикого типу. Ці дані дозволяють припустити, що субтипи nAHR, що експресуються у мітохондріях нокаутних мишей, були менш ефективні у захисті мітохондрій від низьких доз Ca^{2+} , але більш ефективні - від високих, у порівнянні з $\alpha 7$ -вмісними nAHR.

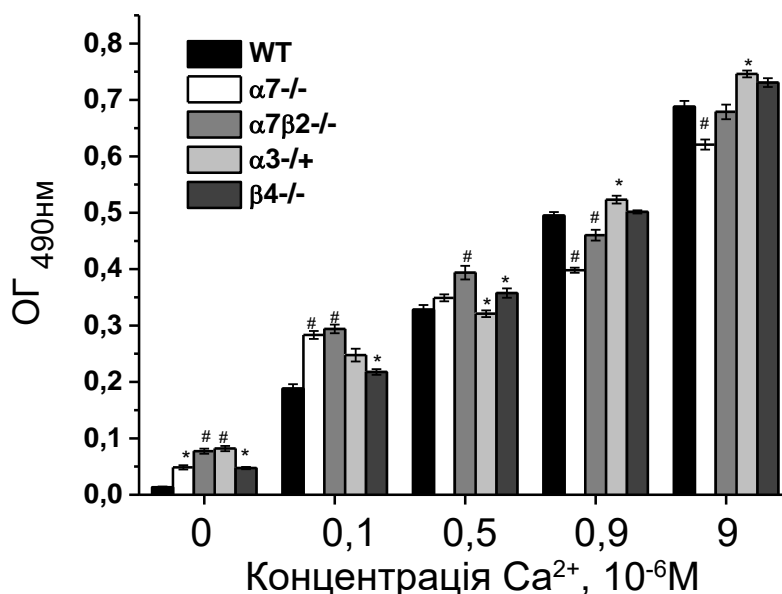


Рис. 3.18. Вивільнення Цит С із мітохондрій печінки мишей дикого типу (WT) та нокаутних ($\alpha 7^{-/-}$, $\alpha 7\beta 2^{-/-}$, $\alpha 3^{-/+}$, $\beta 4^{-/-}$) при дії різних концентрацій іонів Ca^{2+} . Кожний стовпчик відповідає середньому значенню вимірювань \pm стандартна похибка ($n=5$); * - $p < 0.05$; # - $p < 0.0005$ порівняно з диким типом.

Раніше в нашій лабораторії було показано, що вивільнення Цит С з мітохондрій печінки мишей дикого типу може інгібуватися як $\alpha 7$ -специфічним агоністом PNU282987, так і, у меншій мірі, антагоністом метиллікаконітином (MLA), або $\alpha 4\beta 2$ -специфічним дигідро- β -еритроїдином (Dh β E) або $\alpha 3\beta 2$ -специфічним α -конотоксином МП [4]. Ми перевірили вплив цих лігандів на мітохондрії нокаутних мишей. Було показано, що вивільнення Цит С з мітохондрій $\alpha 7^{-/-}$ та $\alpha 7\beta 2^{-/-}$ мишей за дії Ca^{2+} не пригнічувалось PNU282987 та MLA, що підтверджує відсутність $\alpha 7$ -вмісних nAHP (Рис. 3.19). Dh β E та конотоксин МП були менш ефективними для $\alpha 7\beta 2^{-/-}$ та $\alpha 3^{+/-}$ мітохондрій, тому що в них були відсутні $\beta 2$ - або знижувався вміст $\alpha 3$ -вмісних nAHP відповідно.

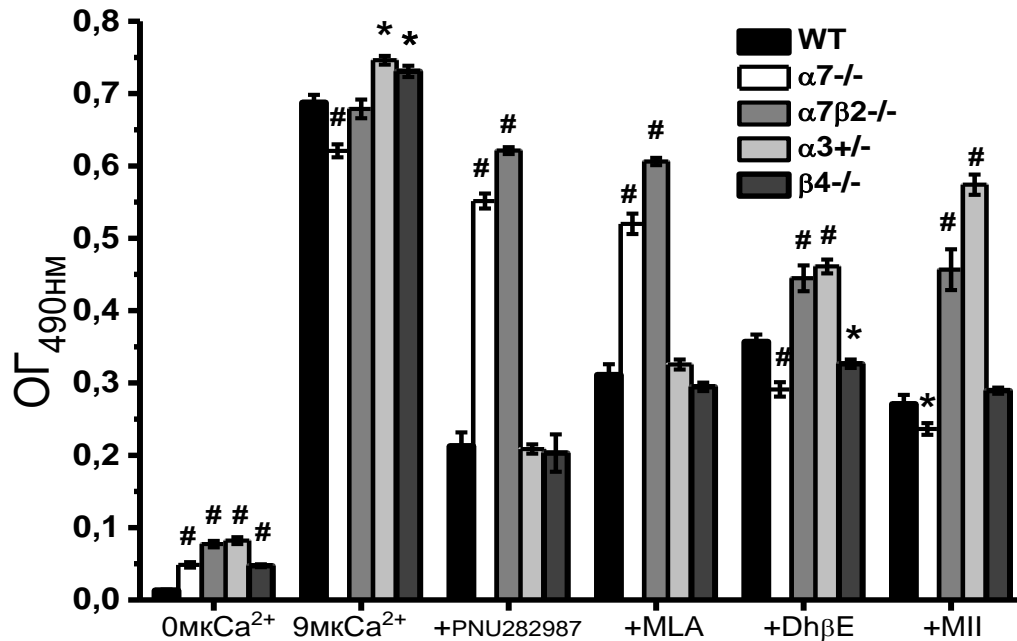


Рис. 3.19. Вивільнення Цит С із мітохондрій печінки мишей дикого типу (WT) та нокаутних ($\alpha 7^{-/-}$, $\alpha 7\beta 2^{-/-}$, $\alpha 3^{+/-}$, $\beta 4^{-/-}$) під дією 9 мкМ Ca^{2+} у присутності PNU282987, метиллікаконітину (MLA), дигідра-бета-еритроїдин (Dh β E) та конотоксин МІІ. Кожний стовпчик відповідає середньому значенню вимірювань \pm стандартна похибка (n=5). * - $p < 0.05$; # - $p < 0.0005$ порівняно з диким типом.

Таким чином, відсутність певних субодиниць нАХР вочевидь впливала на чутливість мітохондрій до відповідних нАХР-специфічних лігандів, але не суттєво змінювала стійкість мітохондрій до дії Ca^{2+} , що свідчило про наявність певних компенсаторних механізмів. Тому наступним кроком ми порівняли субодиничний склад нАХР мітохондрій, виділених із печінки мишей дикого типу і нокаутів.

3.3.2. Підвищений вміст $\alpha 9$ та $\beta 4$ субодиниць нАХР у мітохондріях $\alpha 7$ -/-, $\alpha 7\beta 2$ -/- та $\alpha 3$ +/- нокаутних мишей підтримують стійкість мітохондрій до Ca^{2+}

Нокаутних мишей часто використовують як модель дослідження фізіологічної ролі певних генів та білків. Однак у нокаутних мишей відповідний білок не експресується, починаючи з ембріональної стадії, тому існує велика вірогідність компенсаторних реакцій. Особливо це стосується нАХР, де численні субтипи можуть виконувати подібні функції.

Сендвіч-імуноферментний аналіз (Сендвіч-ІФА) з використанням антитіл, специфічних до різних субодиниць нАХР, підтвердив відсутність відповідних субодиниць у мітохондріях нокаутних мишей та зниження вмісту $\alpha 3$ субодиниці у мітохондріях $\alpha 3$ +/- гетерозиготних мишей. Також було показано, що у мітохондріях печінки відсутність $\beta 2$ або $\beta 4$ субодиниць або зниження $\alpha 3$ субодиниці супроводжується зниженням вмісту $\alpha 4$ субодиниці, а відсутність $\alpha 7$ або $\beta 4$ субодиниць або зниження $\alpha 3$ субодиниці - зниженням вмісту $\beta 2$ субодиниць. Таким чином, підтверджено наявність гетеромерних $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 4\beta 2$ та $\alpha 7\beta 2$ нАХР у мітохондріях печінки мишей [216]. Проте найбільшої уваги привернув той факт, що відсутність $\alpha 7$, $\alpha 7\beta 2$ або зниження $\alpha 3$ субодиниць призводило до значного підвищення вмісту $\alpha 9$ та $\beta 4$ субодиниць нАХР (Рис.3.20).

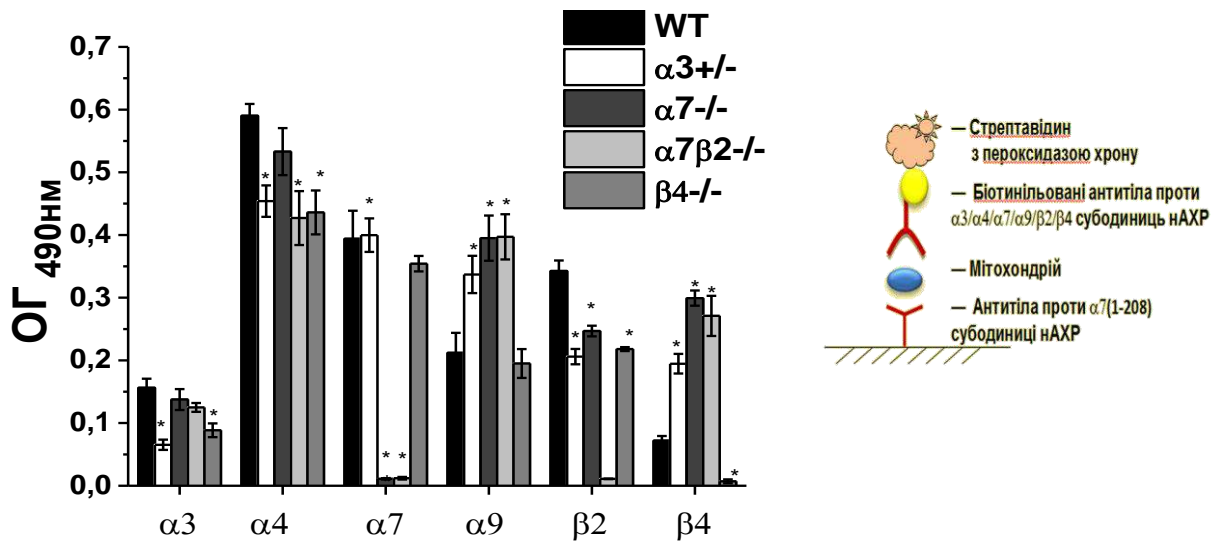


Рис. 3.20. Вміст $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\beta 2$ та $\beta 4$ субодиниць у мишей дикого типу та нокаутних мишей. Кожний стовпчик відповідає середньому значенню вимірювань \pm стандартна похибка (n=5). * - $p < 0.05$ порівняно з диким типом.

Для того, щоб виявити, які гетеромерні субтипи НАХР утворюються у мітохондріях нокаутних мишей при підвищенні вмісту $\alpha 9$ та $\beta 4$ субодиниць, ми використали Сендвіч-ІФА, в якому на дно лунки наносили антитіла, специфічні до $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 9$, $\alpha 10$ або $\beta 4$ субодиниць НАХР, а НАХР мітохондрій, що зв'язався, виявляли біотинільованими антитілами, специфічними до $\alpha 9$ або $\beta 4$ субодиниць.

Було виявлено, що відсутність $\alpha 7$ та $\beta 2$ субодиниць призвела до збільшення вмісту комбінацій $\alpha 9\alpha 10$, $\alpha 3\beta 4$ та $\alpha 4\beta 4$ субодиниць. Це добре відомі субтипи НАХР, описані в численних публікаціях [218], [57], [195]. На наше здивування, ми також виявили чіткий сигнал від комбінації $\alpha 9\beta 4$ (в обох орієнтаціях антитіл). У $\alpha 7\beta 2^{-/-}$ нокаутних мишей вміст цієї комбінації значно підвищений. Ці дані вказують на можливість існування комбінації $\alpha 9\beta 4$ у мітохондріях (Рис 3.21).

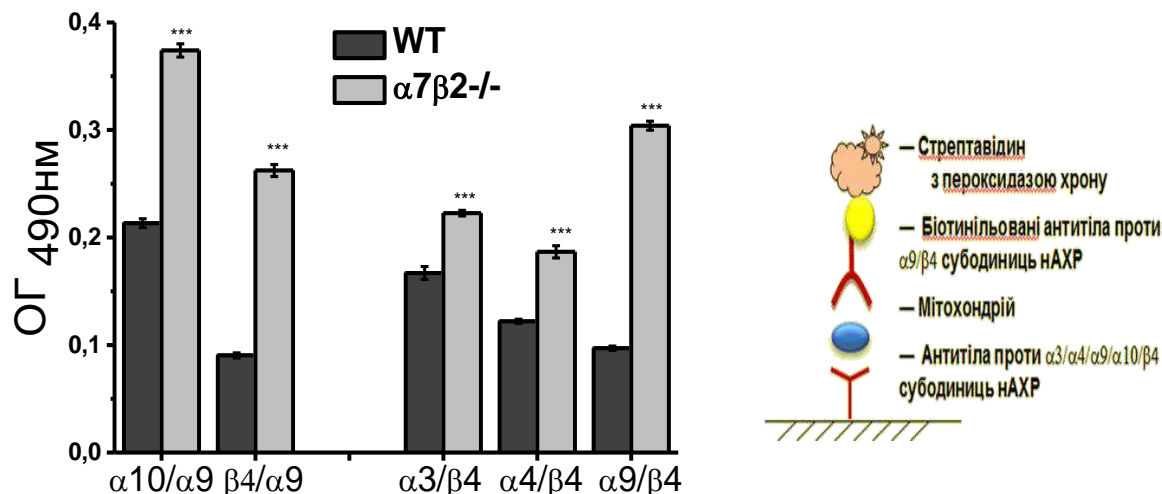


Рис. 3.21. Вміст гетеромерних субтипів nAChR у мітохондріях печінки мишей дикого типу (WT) та $\alpha 7\beta 2^{-/-}$. Кожний стовпчик відповідає середньому значенню вимірювань \pm стандартна похибка ($n=5$). *** $p<0.0005$ порівняно з диким типом.

Для того щоб перевірити, чи залучені $\alpha 9$ -вмісні nAChR, вміст яких збільшується при відсутності $\alpha 7$ субодиниці nAChR, до регуляції вивільнення Цит С з мітохондрій, ми використали $\alpha 9$ -специфічний α -конотоксин PeIA [219], [216].

Було встановлено, що α -конотоксин PeIA пригнічував вивільнення Цит С з мітохондрій під дією Ca^{2+} та, меншою мірою, під дією $0,5 \text{ mM H}_2\text{O}_2$, і його дія за присутності Ca^{2+} була більш вираженою у мітохондріях $\alpha 7^{-/-}$ нокаутних мишей порівняно з мітохондріями мишей дикого типу (Рис. 3.22). Таким чином, $\alpha 9$ -вмісні nAChR функціонально заміщали $\alpha 7$ -вмісні nAChR, сприяючи стійкості мітохондрій до дії Ca^{2+} .

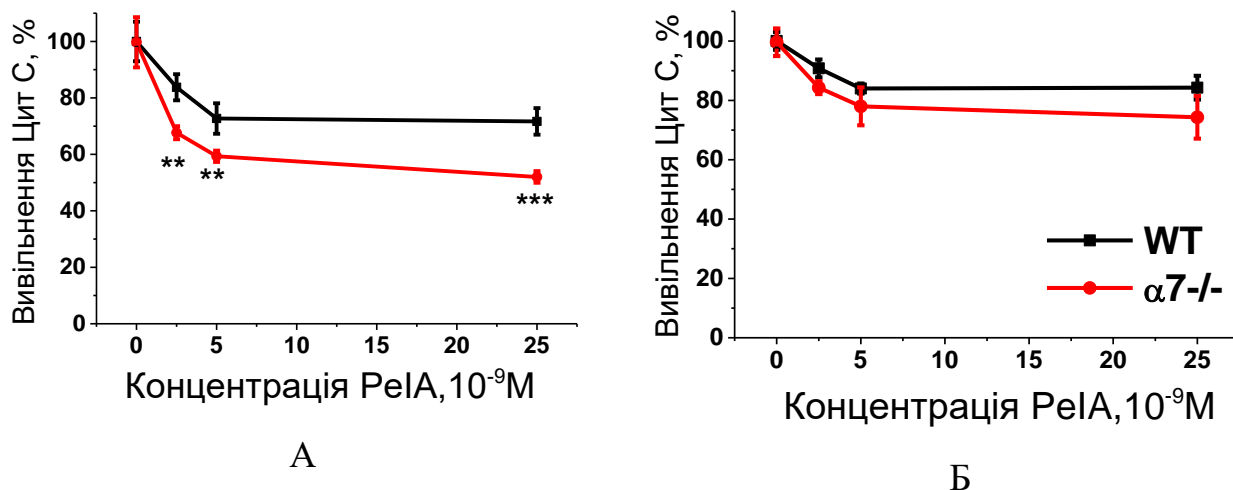


Рис. 3.22. Вплив α -конотоксину PeIA на вивільнення Цит С з мітохондрій печінки мишей дикого типу (WT) та $\alpha 7^{-/-}$ під дією 9 мкМ Ca^{2+} (А) або 0,5 мМ H_2O_2 (Б). ** - $p < 0.005$; *** - $p < 0.0005$ порівняно з диким типом.

Раніше у нашій лабораторії вже спостерігали значне (у декілька разів) підвищення вмісту $\beta 4$ субодиниць у мітохондріях мозку $\alpha 9^{-/-}$ нокаутних мишей [220]. На відміну, вміст nAHR в мітохондріях $\beta 4^{-/-}$ мишей суттєво не відрізнявся від такого в мітохондріях мишей дикого типу, що свідчить про те, що в мітохондріях мишей дикого типу його кількість та функції не значні. $\beta 4$ -вмісні nAHR експресуються переважно у нейронах автономних гангліїв [221], [222] та певних областях мозку [223], проте на даний момент немає даних про їх наявність у незбудливих тканинах. Також відомо, що бета-субодиниці ($\beta 2$ та $\beta 4$) впливають на кінетичні властивості як $\alpha 3$ -вмісних [224], так $\alpha 4$ -вмісних nAHR [225].

Таким чином, в дослідженнях даного підрозділу було показано, що відсутність або нестача $\alpha 3$ -, $\alpha 7$ - або $\beta 2$ -вмісних субтипів nAHR в мітохондріях печінки компенсується появою $\alpha 9$ та $\beta 4$ субодиниць nAHR, що може призводити до формування $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 4$, $\alpha 9\alpha 10$ та $\alpha 9\beta 4$ субтипів nAHR. Нікотинові рецептори, що експресуються у мітохондріях нокаутних мишей, регулюють вивільнення Цит С під дією апоптогенних доз Ca^{2+} , подібно до nAHR мишей дикого типу. Однак порівняно з $\alpha 7\beta 2$ та $\alpha 3\beta 2$ nAHR, представленими в мітохондріях мишей дикого типу, ті субтипи nAHR, що

експресуються компенсаторно, є менш ефективними проти низьких доз Ca^{2+} , але більш ефективними проти високих, отже, здатні контролювати більш серйозні апоптогенні виклики, ніж ті, що стоять перед мишами дикого типу.

$\alpha 9$ субодиниця відноситься до найбільш еволюційно древніх субодиниць nAHR [226]. Першопочатково $\alpha 9$ -вмісні nAHR були виявлені у клітинах внутрішнього вуха [227], але потім була підтверджена їх наявність і в багатьох не-збудливих клітинах [228], [1], нейронах гангліїв дорсального корінця [171], мозку [220] та мітохондріях [1]. $\alpha 9$ субодиниці можуть бути у складі як гомомерних, так і гетеромерних nAHR [20]. Додатково до добре описаної комбінації $\alpha 9\alpha 10$, наші дані вказують на наявність $\alpha 9\beta 4^*$ nAHR у мітохондріях печінки $\alpha 7^{-/-}$ та $\alpha 7\beta 2^{-/-}$ нокаутних мишей. Беручи до уваги, що мітохондрійні nAHR не функціонують як іонні канали [4], можна припустити, що мітохондрії можуть містити нетрадиційні комбінації субодиниць nAHR, які не утворюють функціональних іонних каналів. Підвищення експресії $\alpha 9$ субодиниць nAHR спостерігалось у кератиноцитах [1], В-лімфоцитах [169] та в мозку $\alpha 7^{-/-}$ нокаутних мишей [220], що співпадає з нашими даними. Вивільнення Цит С, стимульоване Ca^{2+} , з мітохондрій печінки $\alpha 7^{-/-}$ нокаутних мишей знижувалось під дією конотоксину ReIA, антагоністу $\alpha 9$ nAHR [219]. Відповідно, $\alpha 9$ -вмісні nAHR також впливають на стійкість мітохондрій печінки до дії Ca^{2+} .

Отримані дані показують, що підвищення вмісту $\alpha 9$ та $\beta 4$ субодиниць nAHR у мітохондріях $\alpha 7^{-/-}$, $\alpha 7\beta 2^{-/-}$ та $\alpha 3^{+/-}$ нокаутних мишей є компенсаторним механізмом для підтримки стійкості мітохондрій до дії апоптогенних чинників.

3.3.3. Мітохондрійні nAHR підтримують життєздатність клітин печінки після часткової гепатектомії

Оскільки мітохондрійні nAHR залучені до регуляції ранніх стадій апоптозу, цікаво було перевірити, як вони реагують на стресові, екстремальні ситуації, які потребують максимальної виживаності клітин. Для цього нами

було обрано модель часткової гепатектомії (ЧГЕ) – хірургічної операції, під час якої видаляється 2/3 печінки, а частина, що залишилася, швидко регенерує. Процес регенерації печінки після ЧГЕ детально досліджений. Відомо, що в перші години після операції підвищується стійкість клітин печінки до апоптозу [229]. Наші дослідження були спрямовані на визначення спектру і функціональної активності nAHP мітохондрій у різні строки після ЧГЕ [216].

Експерименти проводили на щурах. Видалена частина печінки була використана в якості індивідуального контролю, а частину печінки, що залишилась, досліджували через 3, 6, 12 і 24 год після операції. Також для додаткового контролю окремій групі щурів була проведена лапаротомія - операція, при якій черевна порожнина відкривається, але печінка залишається інтактною. Лапаротомія проводиться для того, щоб виключити вплив стресу, пошкодження шкіри, анестезії та запалення, що має місце і під час ЧГЕ. Для того, щоб мінімізувати кількість тварин у експерименті, ми провели дослідження з використанням однієї тварини на одну часову точку, а потім для статистичної достовірності отриманих результатів додали більше щурів на найбільш важливі проміжки часу (3 та 6 годин для ЧГЕ, 6 та 12 годин для лапаротомії). Отримані з печінки щурів мітохондрії були досліджені у функціональному тесті з виділення Цит С при дії 0.9 мкМ Ca^{2+} або 0.5 мМ H_2O_2 , а наявність різних типів nAHP у мітохондріях та не-мітохондрійній фракції були досліджені методом Сендвіч-ІФА.

У першій серії експериментів (по одній тварині на часову точку) було виявлено, що в мітохондріях печінки вміст $\alpha 3$, $\alpha 7$ та $\alpha 9$ субодиниць nAHP підвищився вже через 3 години після гепатектомії, найвищий рівень спостерігався через 6 годин (Рис 3.23, А). Напроти, у фракції печінки, збідненій на мітохондрії, рівень відповідних субодиниць знизився через 3 години після операції; проте на 6 годину після операції також значно зріс. Надалі (через 12 та 24 години) рівень як мітохондрійних, так і не-мітохондрійних nAHP повернувся майже до післяопераційного рівня (Рис. 3.23, Б). В наступній серії дослідів було використано по 3 щура на вибрані часові точки і більш широкий спектр антитіл,

специфічних до субодиноць нАХР. Було виявлено, що через 3 години після ЧГЕ у мітохондріях підвищувався вміст $\alpha 3$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$ та $\beta 2$ субодиноць нАХР, в той час як вміст $\alpha 7$ та $\beta 2$ субодиноць у не-мітохондрійній фракції знижувався. Вміст $\alpha 9$ та $\alpha 10$ субодиноць зріс в обох фракціях печінки.

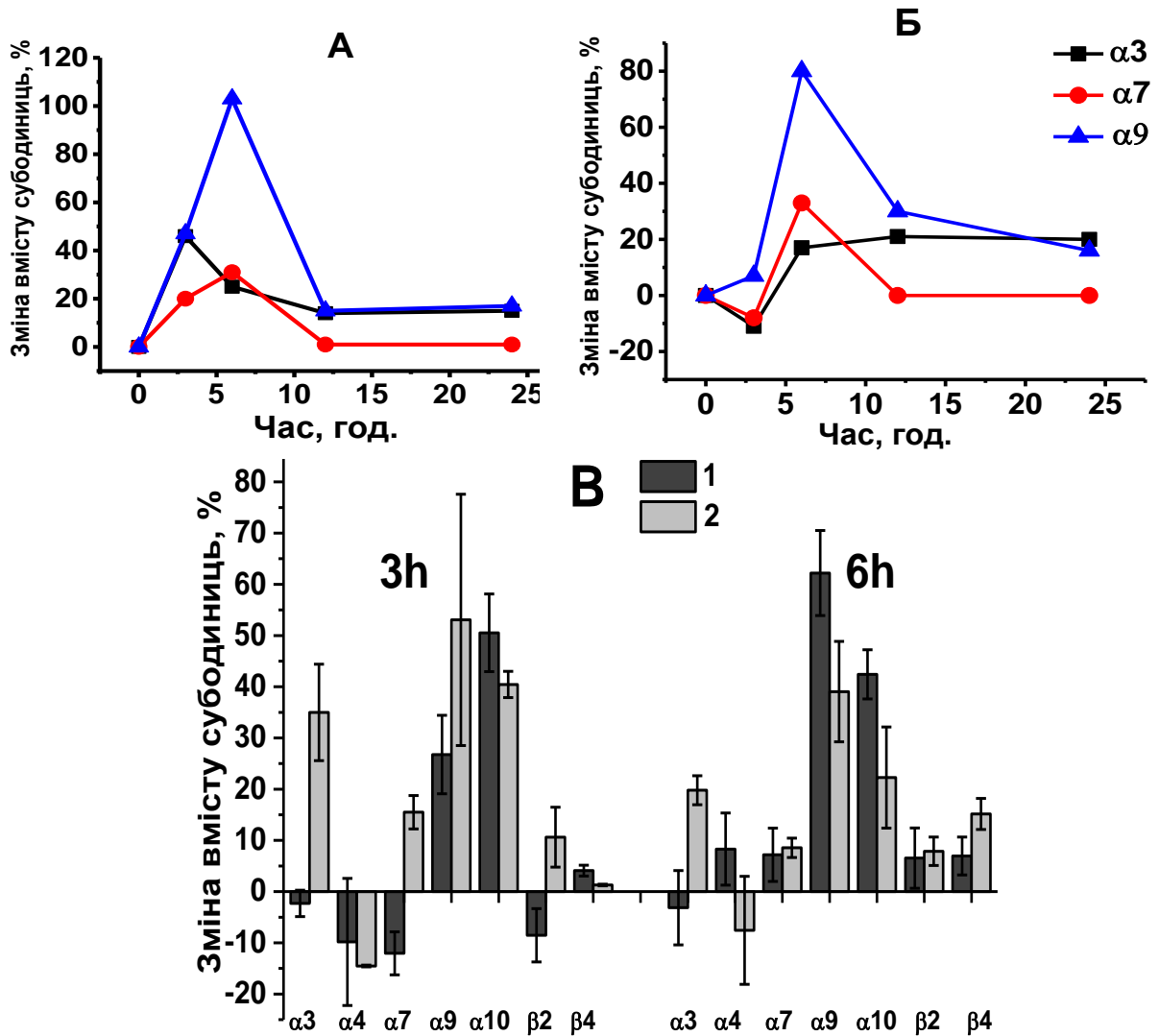


Рис. 3.23. Зміни вмісту субодиноць нАХР (у %, порівняно з видаленою частиною печінки щурів під час операції, 0год.) у мітохондріях (А, 2) та не-мітохондрійній фракції (Б, 1) після часткової гепатектомії. А, Б – один щур на кожну часову точку, В – по три щури на кожну часову точку (кожний стовпчик відповідає середньому значенню вимірювань \pm стандартна похибка).

Через 6 годин, підвищений рівень $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\beta 2$ та $\beta 4$ спостерігався у не-мітохондрійній фракції; також у мітохондріях спостерігався деякий приріст $\beta 4$

субодиниць nAHR (Рис. 3.23, В). Ці дані дають можливість припустити, що через 3 години після ЧГЕ відбувається перерозподіл загального клітинного пулу nAHR на користь мітохондрій, а через 6 годин синтез *de novo* відновлює не-мітохондрійні nAHR і підвищує загальний рівень цих рецепторів в обох фракціях.

За даними Сендвіч-ІФА з дослідження комбінацій субодиниць, було показано, що на ранніх стадіях регенерації печінки (6 год) відбувається підвищення вмісту $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 7\beta 2$ та $\alpha 9\alpha 10$ субтипів nAHR у мітохондріях.

Відповідно до даних функціонального тесту, через 3 та 6 годин після ЧГЕ мітохондрії печінки, вивільнювали менше Цит С при дії Ca^{2+} або H_2O_2 порівняно з доопераційним рівнем, а пізніше рівень Цит С повертався до передопераційного. Таким чином, підвищення рівнів $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 7\beta 2$ та $\alpha 9\alpha 10$ субтипів nAHR супроводжувалось збільшенням стійкості мітохондрій печінки до апоптогенних стимулів.

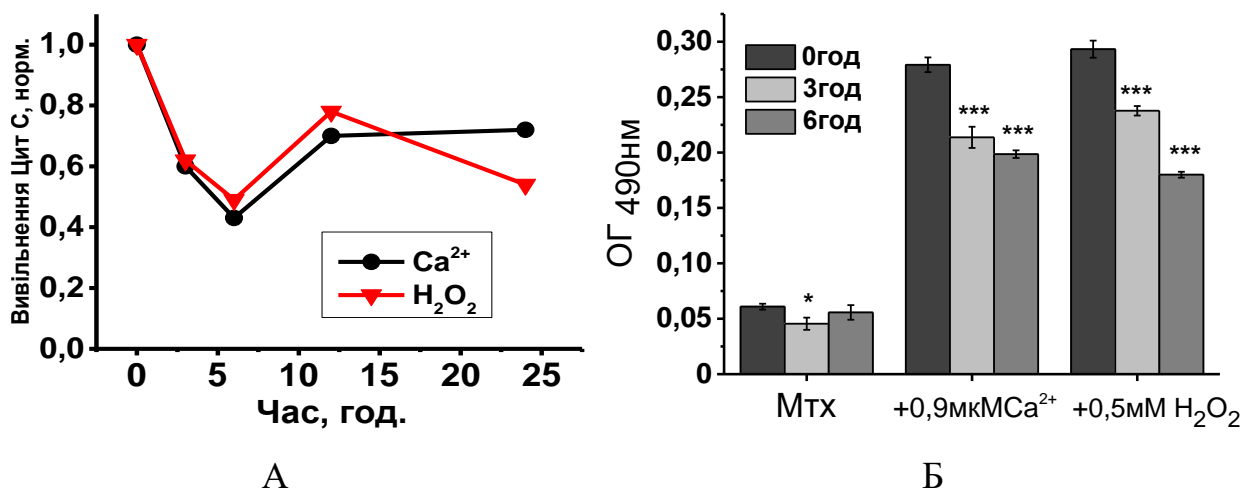


Рис. 3.24. Вивільнення Цит С з мітохондрій печінки щурів після частковою гепатектоїї під дією Ca^{2+} або H_2O_2 . А - один щур на кожну часову точку (за 1,0 прийнято вивільнення Цит С з мітохондрій печінки, видаленої під час операції, 0 год.), В - по три щури на кожну часову точку (кожний стовпчик відповідає середньому значенню вимірювань \pm стандартна похибка). * - $p < 0.05$; *** - $p < 0.0005$ - порівняно з мітохондріями печінки, видаленої під час операції, 0 год.).

В контрольних експериментах з лапаротомії у мітохондріях вміст всіх субодиниць, крім $\alpha 9$, значно знизився через 3 та 6 годин після операційного втручання, а відновлення рівнів $\alpha 4$, $\alpha 7$ та $\beta 2$ субодиниць спостерігалось тільки на 12 годину (Рис. 3.25, А). У фракції печінки, збідненій на мітохондрії, вміст $\alpha 4$, $\alpha 7$ та $\beta 2$ субодиниць також був знижений через 3 години після операції; рівень цих субодиниць почав відновлюватися вже на 6 годину після операції (Рис. 3.25, Б).

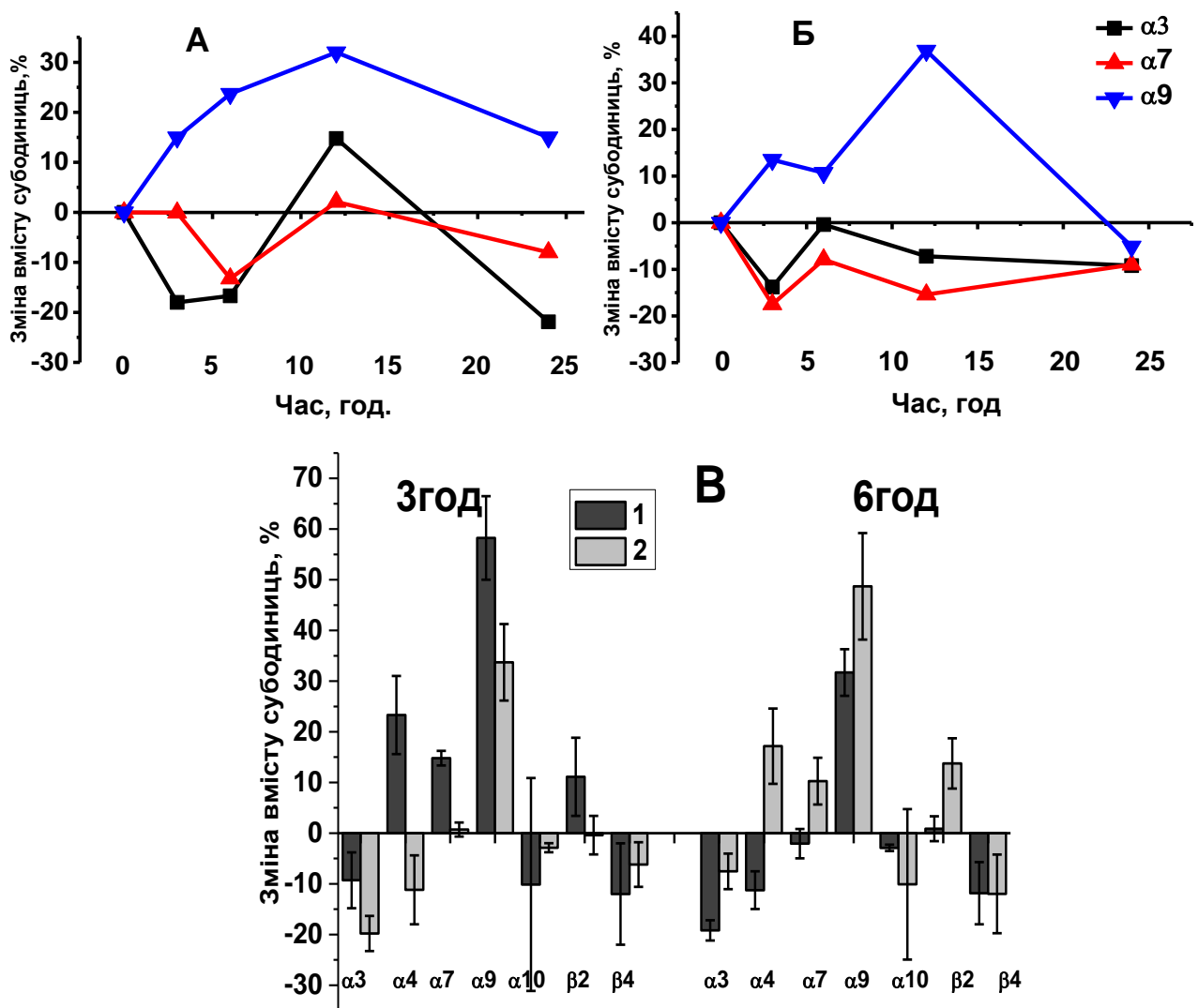


Рис. 3.25. Зміни вмісту субодиниць НАХР (у %, порівняно з видаленою частиною печінки щурів під час операції, 0год.) у мітохондріях (А, 2) та не-мітохондрійній фракції (Б, 1) після лапаротомії. А, Б – один щур на кожну часову точку, В – по три щури на кожну часову точку (кожний стовпчик відповідає середньому значенню вимірювань \pm стандартна похибка).

В обох фракціях, починаючи вже з 3 години, найбільше зростав вміст $\alpha 9$ субодиниці, але збільшення $\alpha 10$ субодиниці не відбувалось (Рис. 3.25, В). Таким чином, лапаротомія супроводжувалась зниженням у печінці рівня усіх субодиниць НАХР, окрім $\alpha 9$, вміст якої значно зріс, а відновлення рівня $\alpha 4\beta 2$ та $\alpha 7\beta 2$ почалося з не-мітохондрійної фракції через 6 годин після операції.

У функціональному тесті, мітохондрії печінки щурів, яким була проведена лапаротомія, вивільняли більше Цит С у порівнянні з мітохондріями неоперованих тварин (Рис. 3.26), тобто зниження кількості мітохондрійних НАХР супроводжувалось зменшенням стійкості мітохондрій до апоптогенного впливу. При цьому підвищення $\alpha 9$ -вмісних НАХР не компенсувало дефіциту інших субтипів НАХР.

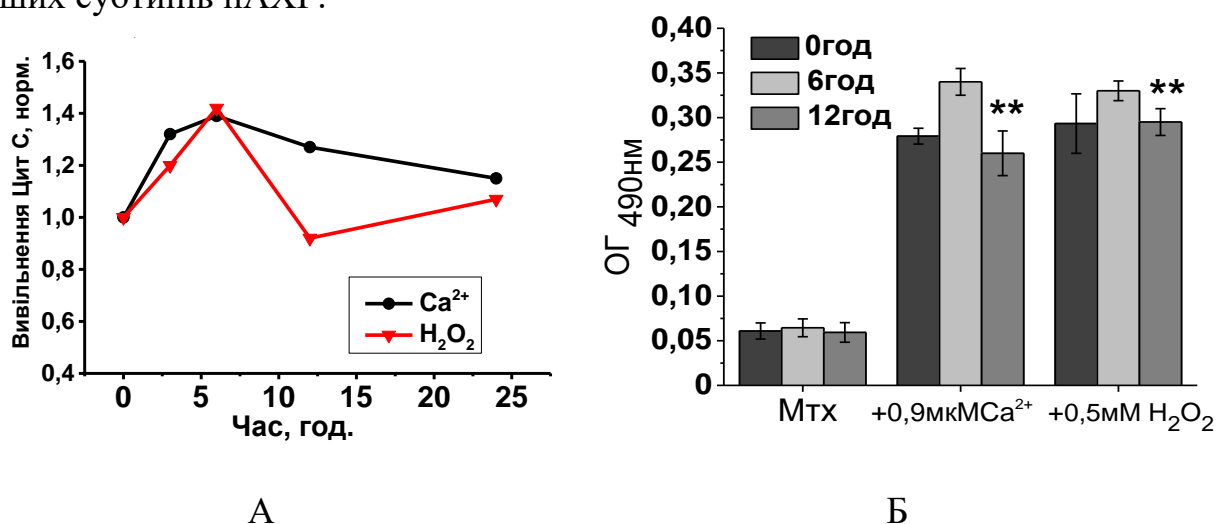


Рис. 3.26. Вивільнення Цит С з мітохондрій печінки щурів після лапаротомії під дією Ca²⁺ або H₂O₂. А - один щур на кожну часову точку (за 1,0 прийнято вивільнення Цит С з мітохондрій печінки неоперованих щурів, 0 год.), В – по три щури на кожну часову точку (кожний стовпчик відповідає середньому значенню вимірювань \pm стандартна похибка). ** - $p < 0.005$ - порівняно з мітохондріями печінки не оперованих щурів, 0 год.).

Таким чином, лапаротомія та ЧГЕ по-різному впливали на НАХР мітохондрій печінки, що відображає різні фізіологічні процеси ініційовані в цих двох операціях. Спільним було лише підвищення вмісту $\alpha 9$ субодиниць НАХР як у мітохондріях, так і у фракції, збідненій на мітохондрії. Однак після ЧГЕ

підвищення $\alpha 9$ супроводжувалось зростанням вмісту $\alpha 10$ субодиниці, що вказує на експресію гетеромерного субтипу $\alpha 9\alpha 10$, в той час як після лапаротомії $\alpha 9$ субодиниця, вірогідно, була включена до складу гомомерних рецепторів.

Очевидно, що швидке та драматичне збільшення субодиниць $\alpha 9$ НАХР в печінці щурів після ЧГЕ та лапаротомії було пов'язано з трансляцією наявних РНК. Великий вміст $\alpha 9$ РНК був виявлений у лімфоцитах [230], [231,232], хоча в той самий час вміст білка $\alpha 9$ НАХР був незначний [169]. Тому, здається, що ця еволюційно древня α -субодиниця зберігається в якості резерву, і її кількість може бути швидко збільшена у відповідь на зовнішні фактори, такі як стрес або біль, викликані операцією. α -вмісні НАХР розглядалися як ціль для лікування хронічного болю [233]; отже, їх регуляція може бути пов'язана з реакцією на біль, яку неможливо повністю виключити, незважаючи на ефірний наркоз і анальгетики, які використовувалися в наших експериментах.

Щоб визначити внесок $\alpha 9$ -вмісних НАХР у підтримання апоптогенної стійкості мітохондрій після ЧГЕ/ЛТ, ми порівняли вплив α -конотоксину ReIA на мітохондрії, що були виділені з печінки в ході гепатектомії, печінки, що регенерувала, та печінки після лапаротомії. α -конотоксин ReIA набагато ефективніше пригнічував вивільнення Цит С з мітохондрій після ЧГЕ або лапаротомії, порівняно з мітохондріями інтактної печінки, що відповідає підвищенню рівня $\alpha 9$ -вмісних НАХР після обох типів операцій (Рис. 3.27). За дії Ca^{2+} , 5 нМ α -конотоксин ReIA був більш ефективним після лапаротомії, порівняно з ЧГЕ (50% проти 30% інгібування). На відміну, за дії H_2O_2 , 25 нМ ReIA виявився більш ефективним після ЧГЕ, ніж після лапаротомії (60% проти 40% інгібування, відповідно). В мітохондріях щурів, яким була проведена лапаротомія, 5нМ ReIA був однаково ефективним як проти Ca^{2+} , так і проти H_2O_2 (приблизно 50% інгібування). Беручи до уваги різні $\alpha 9$ -вмісні субтипи НАХР, що експресуються у мітохондріях після ЧГЕ або лапаротомії, ці дані вказують, що за дії α -конотоксину ReIA гомомерні $\alpha 9$ рецептори (лапаротомія) однаково ефективно протидіють Ca^{2+} і H_2O_2 , в той час як гетеромерні $\alpha 9\alpha 10$ (ЧГЕ) переважно ефективні проти H_2O_2 .

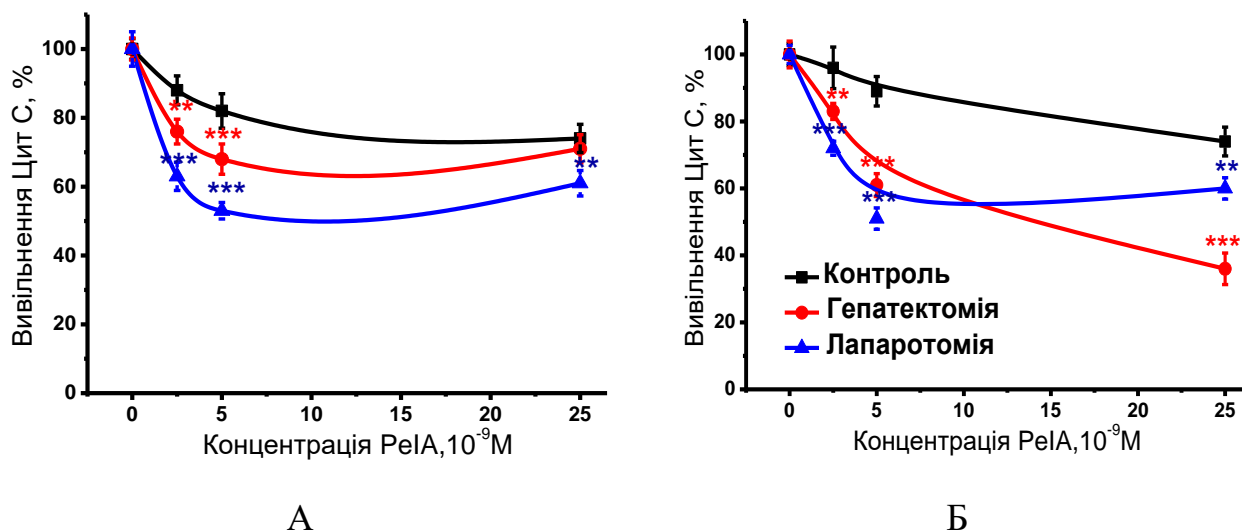


Рис. 3.27. Вплив б-конотоксину PeIA під дією Ca²⁺ (А) або H₂O₂ (Б) на вивільнення Цит С з мітохондрій печінки неоперованих щурів (Контроль), після часткової гепатектомії (Гепатектомія) або після лапаротомії (Лапаротомія) на 6 годину після операції. Кожна точка відповідає середньому значенню вимірювань ± стандартна похибка. ** - p < 0.005, *** - p < 0.0005 - порівняно з мітохондріями печінки не оперованих щурів, 0 год.

Приймаючи до уваги, що Ca²⁺ впливає на CaKMP-залежний шлях, а H₂O₂ – на мітохондрійні Src-кінази [4], можна сказати, що зв'язування з гомомерним α9 nAHP (лапаротомія) впливає однаково на CaKMP- та Src-залежний шлях, в той час як зв'язування з гетеромерним α9α10 nAHP (ЧГЕ) стимулює Src-залежний шлях. Ці два підтипи nAHP мають досить схожі кінетичні властивості [218]. Проте присутність α10 субодиниць може впливати або на саму взаємодію з конотоксином PeIA, або на конформаційні зміни, що викликані його зв'язуванням, і необхідні для підключення до каскадів внутрішньомітохондрійного сигналювання. Здатність α9 nAHP контролювати як CaKMP-, так і Src-залежні шляхи демонструє універсальну природу цього древнього підтипу nAHP, що пояснює першочергову регуляцію α9 nAHP в критичних обставинах.

Як описано в підрозділі 3.3.2, в мітохондріях α7-/- нокаутних мишей конотоксин PeIA впливав більшою мірою на вивільнення Цит С за дії Ca²⁺,

тобто $\alpha 9\alpha 10$ та $\alpha 9\beta 4$ НАХР, виявлені у мітохондріях $\alpha 7$ -/- нокаутних мишей, регулюють переважно СаКМІІ-залежний шлях апоптозу. Ймовірно, це пов'язано з тим, що $\alpha 9$ -вмісні НАХР, експресовані у $\alpha 7$ -/- нокаутних мишей, компенсують контроль СаКМІІ-залежного шляху за відсутності $\alpha 7$ субодиниць, в той час як Src-кінази перебувають під контролем інших субтипів НАХР. Крім того, ми не можемо виключити, що зв'язок НАХР з внутрішньомітохондрійними кіназами неоднаковий у мишей та щурів.

Часткова гепатектомія (ЧГЕ), коли 70% органу видаляється, є класичною та добре охарактеризованою моделлю для дослідження регенерації тканини у ссавців. Значне ушкодження печінкової паренхіми стимулює перехід клітин печінки зі стану спокою до стану проліферації з відновленням маси та функції печінки [229], [234]. Додатково, пошкодження печінки стимулює імунну реакцію, що супроводжується продукцією цитокінів та залучення багатьох сигнальних шляхів, що попереджає печінкову недостатність [235], [236].

Зміни, які відбуваються після ЧГЕ, добре описані. Перша фаза настає через 3 години після операції та включає продукування протизапальних цитокінів (IL-6, TNF α) та експресію інтегринів для підтримки клітинної комунікації. Синтез ДНК починається у гепатоцитах через 11-12 годин, а пік підвищення спостерігається через 24 години від операції [237]. Період ініціації регенерації супроводжується пригніченням апоптозу та покращенням стану виживання гепатоцитів і, як правило, пояснюється впливом транскрипційних факторів NF κ B і STAT та інгібуванням каспази 3 і каспази 8 [238]. Ми спостерігали збільшення вмісту білків НАХР в мітохондріях печінки через 3 години після ЧГЕ, що супроводжувалося зменшенням субодиниць $\alpha 7$ та $\beta 2$ у фракції, збідненій на мітохондрії. Через 6 годин збільшення кількості субодиниць НАХР було виявлено як у мітохондріях, так і в не-мітохондрійній фракції. Це означає, що під час первинної фази регенерації печінки наявний внутрішньоклітинний запас НАХР перерозподіляється на користь мітохондрій, а далі підтримується синтезом *de novo*. Відповідно, на 3 та 6 годину після ЧГЕ

мітохондрії вивільняють значно менше Цит С у відповідь на дію Ca^{2+} або H_2O_2 , ніж мітохондрії, виділені з інтактною печінки. На 12 годину від операції, коли починається синтез ДНК (проліферативна фаза), рівень нАХР та вивільнення Цит С з мітохондрій повертаються майже до перед-операційного рівня.

Ці дані дозволяють чітко встановити, що мітохондрійні нАХР вкрай важливі під час фази ініціації регенерації печінки, сприяючи виживанню гепатоцитів, але не під час фази проліферації, що відбувається пізніше.

Під час лапаротомії не відбувається пошкодження печінки, але операція включає реакцію стресу та місцеве запалення [239]. На противагу до ЧГЕ, рівень усіх мітохондрійних субодиниць нАХР, окрім $\alpha 9$, знижувався на 3 та 6 годину після лапаротомії. Мітохондрії печінки вивільнювали більше Цит С у відповідь на Ca^{2+} або H_2O_2 на 6 годину після лапаротомії. Коли печінка не була пошкоджена, стійкість її мітохондрій не була критичною.

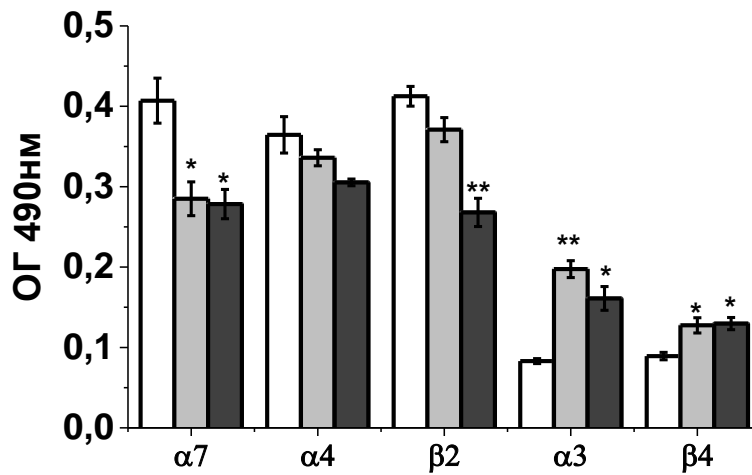
3.3.4. Дослідження впливу запалення у мозку на мітохондрійні нАХР.

Нейрозапалення супроводжує і часто передує розвитку нейродегенеративних захворювань, таких як хвороби Паркінсона та Альцгеймера [240] і може бути одним з патогенних чинників виникнення нейродегенерації [241], [242]. Проте молекулярні механізми, що пов'язують запальні реакції з процесами дегенерації в мозку, погано зрозумілі. Відомо, що $\alpha 7$ нікотиніві ацетилхолінові рецептори, що локалізовані в плазматичній мембрані імунних клітин, регулюють запальні процеси в різних тканинах, включаючи головний мозок [243].

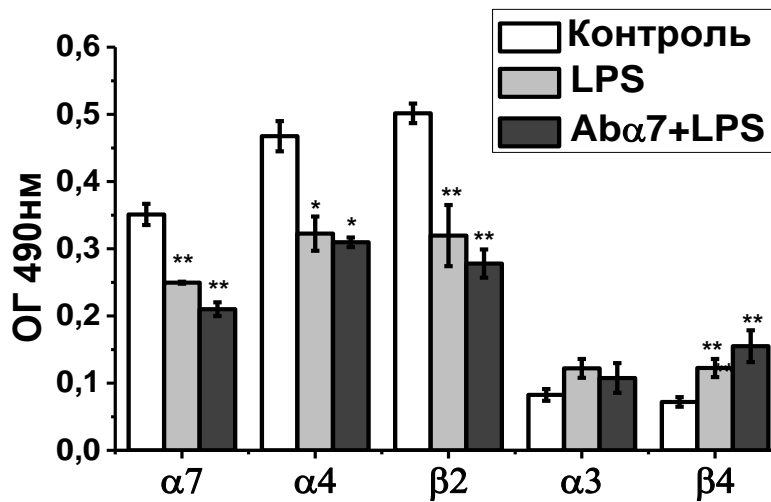
Функціонування мітохондрій є вкрай важливим для клітин мозку: як для підтримки його біоенергетики, так і для стійкості проти апоптогенного впливу. Тому нашим завданням було визначити роль мітохондрійних нАХР у патогенних процесах запалення в мозку [244]. В попередніх експериментах, проведених в лабораторії імунології клітинних рецепторів, було показано, що

нейрозапалення можна викликати регулярним введенням мишам бактерійного ліпополісахариду (ЛПС) або імунізацією позаклітинним фрагментом (1-208) $\alpha 7$ нАХР; обидва способи призводили до зниження рівню $\alpha 7$ нАХР, накопичення патогенної форми амілоїду-бета в мозку і погіршення пам'яті експериментальних тварин протягом декількох місяців [245]. В наших експериментах ми змоделювали гостре запалення дворазовим, через день, введенням мишам ЛПС. Друга група мишей додатково кожен день отримувала внутрішньовенні ін'єкції $\alpha 7(1-208)$ -специфічних антитіл. На четвертий день мишей виводили з експерименту і досліджували їх мозок та мітохондрії мозку.

Як показано на Рис. 3.28, А, введення ЛПС знижувало рівень $\alpha 7$ субодиниць нАХР в мозку мишей (без мітохондрій), при цьому підвищувались рівні $\alpha 3$ та $\beta 4$ субодиниць. Додаткове введення $\alpha 7(1-208)$ -специфічного антитіла знижувало ще й $\beta 2$ субодиниці і запобігало підвищенню $\alpha 3$ субодиниць. У фракції мітохондрій введення ЛПС або ЛПС+ $\alpha 7(1-208)$ -специфічного антитіла зменшувало рівень $\alpha 7$, $\alpha 7\beta 2^*$ та $\alpha 4\beta 2$ нАХР та незначно підвищувало рівень $\alpha 3\beta 4$ субтипу (Рис. 3.28,Б). Таким чином, запалення, викликане ЛПС, впливало на загальний клітинний рівень нАХР. В експериментах, проведених в лабораторії проф. Хермони Сорек, було з'ясовано, що при цьому знижувався рівень мРНК $\alpha 7$ субодиниці, тобто зміни відбувались на рівні експресії гену $\alpha 7$. Додаткове зниження інших субтипів нАХР за дії антитіл, вірогідно, було пов'язаним із їх посиленням метаболізмом, стимульованим антитілом.



А



Б

Рис 3.28. Рівень α 3, α 4, α 7, β 2 та β 4 субодиниць nAChR у не-мітохондрійній фракції (А) та фракції мітохондрій (В) мозку мишей, яким вводили ліпополісахарид (LPS) або α 7(1–208)-специфічні антитіла + ЛПС (Ab α 7 + LPS) у порівнянні з контрольною групою тварин (Контроль). * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$ у порівнянні з контролем.

У функціональному тесті, мітохондрії, виділені з мозку мишей, яким вводили ЛПС, вивільняли незначний рівень Цит С навіть без дії Ca^{2+} , що відображає їх нестабільний (перед-апоптотичний) стан. Вони також вивільняли більше Цит С при дії 0,9 мкМ і 9,0 мкМ Ca^{2+} і ставали менш чутливими до впливу α 7-специфічного агоніста PNU282987, ніж мітохондрії контрольних

тварин (Рис. 3.29). $\alpha 7(1-208)$ -специфічні антитіла знижували ЛПС-індуковане вивільнення Цит С з мітохондрій при низьких дозах Ca^{2+} та посилювали нормалізуючий ефект PNU282987.

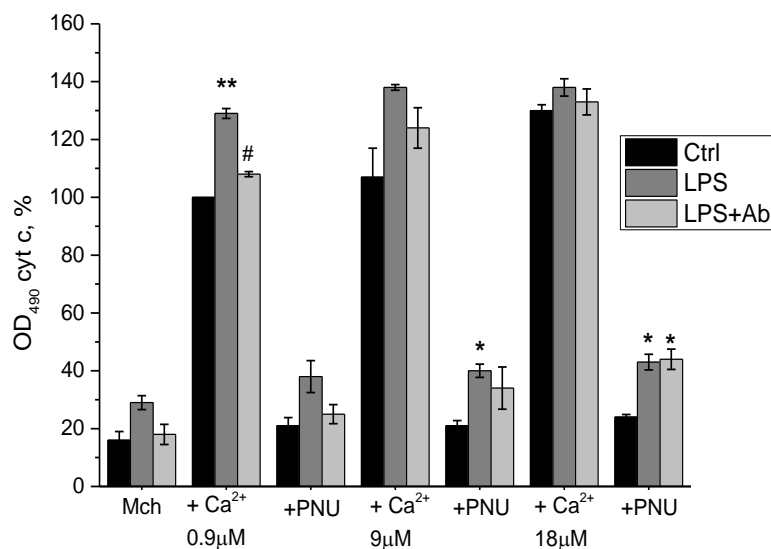


Рис. 3.29. Вивільнення Цит С з мітохондрій мозку мишей, яким вводили ліпополісахарид (LPS) або $\alpha 7(1-208)$ -специфічні антитіла + ЛПС (Ab $\alpha 7$ +LPS). * - $p < 0.05$ у порівнянні з контрольними мишами при дії Ca^{2+} та/або PNU282987; # - $p < 0.05$ у порівнянні з ЛПС.

Таким чином, навіть короточасна дія ЛПС знижувала експресію мітохондрійних $\alpha 7$ НАХР і робила мітохондрії мозку більш чутливими до апоптогенної дії Ca^{2+} . Паралельно введені $\alpha 7$ -специфічні антитіла запобігали вивільненню Цит С з мітохондрій і, відповідно, підтримували їхню стійкість до апоптогенного впливу. Оскільки $\alpha 7(1-208)$ -специфічні антитіла *in vitro* пригнічували Ca^{2+} -індуковане вивільнення Цит С з мітохондрій [4], ми висунули гіпотезу, що антитіла можуть проникати в клітини мозку і безпосередньо впливати на мітохондрії, що узгоджується з недавно отриманими даними відносно анти-мітохондрійних антитіл у пацієнтів з *Pemfigus vulgaris* [162]. Проте, антитіла, додані *in vitro* до клітин лінії U373, проникали всередину клітин, але не зв'язувались з мітохондріями [159], тобто

вплив антитіл на мітохондрії є непрямим. Подальші експерименти, проведені у лабораторії проф. Сорек, показали, що чинниками, які впливають на мітохондрії за дії антитіл, можуть бути мікроРНК, що регулюють експресію багатьох генів, включаючи гени про- і анти-апоптичних протеїнів [244].

Отримані нами дані показують, що мітохондрійні нАХР швидко реагують на стимули запалення, що робить мітохондрії менш стійкими до апоптогенного впливу і сприяє розвитку патологічних процесів в мозку.

3.3.5. Дослідження впливу N-стеароїлетаноламіну на стан мітохондрійних нАХР

Наступним кроком було з'ясувати, чи може проти-запальна терапія поліпшити стан мітохондрій і мітохондрійних нАХР при нейрозапаленні. З цією метою ми використали як лікувальний засіб протизапальний та мембранно-стабілізуючий препарат N-стеароїлетаноламін [246].

N-стеароїлетаноламін (NSE) є природним компонентом мембран клітин ссавців поряд з іншими N-ацилетаноламінами, такими як N-пальмітоїлетаноламін, N-олеїлетаноламін і N-лінолеїлетаноламін, які є фізіологічно важливими для захисту клітин від різних патологічних станів [173], [247], [248]. Механізм дії N-ацилетаноламінів включає або безпосереднє включення їх до мембран клітин, або їх взаємодію зі специфічними клітинними рецепторами: каннабіноїд, ванілоїд, ядерний PPAR [249], [250], [251]. Як наслідок, N-ацилетаноламіни можуть стабілізувати клітинні мембрани та впливати на активність різних іонних каналів кальцію, калію, хлориду та лігандів, в тому числі $\alpha 7$ нАХР [252]. В попередніх експериментах, проведених у відділі біохімії ліпідів Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна, було показано виражену проти-запальну дію NSE на моделях термічних опіків та бактерійних інфекцій [175].

Ми досліджували вплив NSE на мітохондрії мозку мишей, яким було проведено дві внутрішньочеревні ін'єкції ЛПС з проміжком у 4 тижні. Миші

отримували NSE *per os* протягом 4 днів до і 5 днів після введення ЛПС. Через тиждень після останнього введення ЛПС мишей досліджували у поведінковому тесті, а їх мозок і мітохондрії мозку – у тестах на вміст субодиниць nAHP, A β (1-42) та вивільнення Цит С за дії Ca²⁺.

Було показано, що двократне введення ЛПС суттєво погіршувало епізодичну пам'ять експериментальних тварин: індекс дискримінації (DI) в тесті «Розпізнавання нового об'єкту» знизився майже у 5 разів (Рис 3.30). Вживання NSE запобігало погіршенню пам'яті за дії ЛПС.

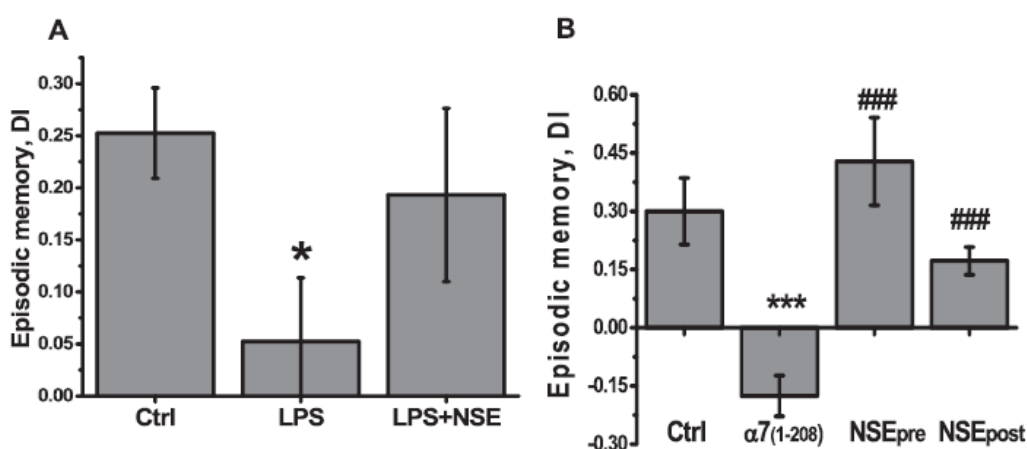


Рис. 3.30. Вплив N-стероїлетаноламіну (NSE) на епізодичну пам'ять мишей:

А – мишей, яким вводили ліпополісахарид (LPS) або ЛПС та NSE (LPS + NSE)

В - $\alpha 7(1-208)$ -імунізованих мишей ($\alpha 7(1-208)$), мишей, яким вводили NSE 4 дні до введення ЛПС (NSE_{pre}) або мишей, яким вводили NSE 5 днів після введення ЛПС (NSE_{post}).

DI – дискримінантний індекс. Кожна колонка відповідає середньому значенню \pm стандартна похибка. * - $p < 0.05$ порівняно з інтактною групою мишей (**Ctrl**); ### - $p < 0.0005$ порівняно з - $\alpha 7(1-208)$ -імунізованими мишами, яким не вводили NSE.

Введення ЛПС дещо знижувало рівень $\alpha 7$ nAHP в мітохондріях мозку мишей і сприяло накопиченню в них патогенної форми A β (1-42), а вживання NSE запобігало обом процесам (Рис. 3.31).

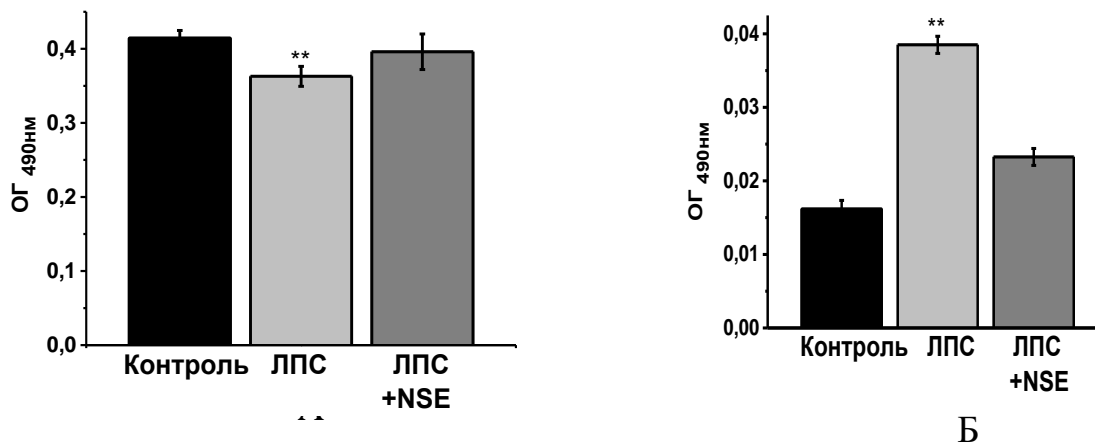


Рис. 3.31. Вміст $\alpha 7$ nAChR (А) та β -амілоїду (1-42) (Б) у мозку мишей, яким вводили ліпополісахарид (ЛПС) або ЛПС та NSE (LPS + NSE). ** $p < 0.005$ у порівнянні з Контролем.

У функціональному тесті мітохондрії мозку мишей, що отримували ЛПС, вивільняли значно більше Цит С як самі по собі, так і у відповідь на $0,9 \text{ мкМ Ca}^{2+}$, і гірше відповідали на $\alpha 7$ -специфічний агоніст PNU282987, ніж мітохондрії контрольних мишей. Вживання NSE запобігало погіршенню стану мітохондрій мозку і, фактично, повертало їх до стану контрольних (Рис. 3.32).

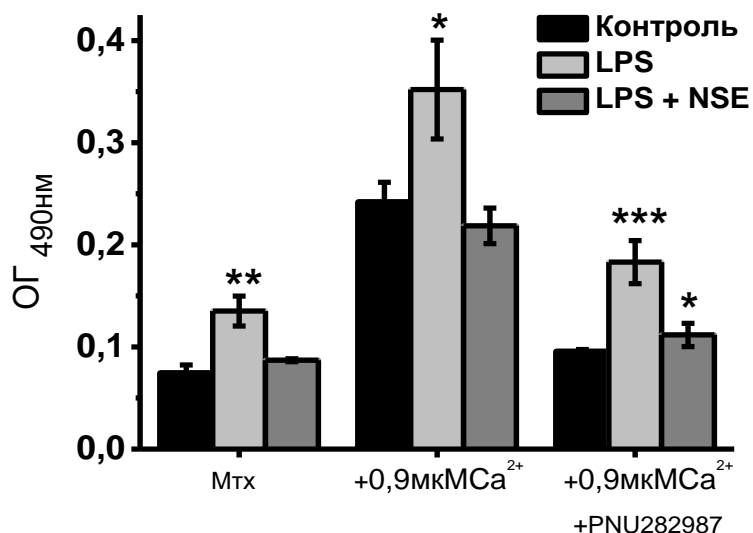


Рис. 3.32. Вивільнення Цит С з мітохондрій мозку мишей, яким вводили ліпополісахарид (LPS) або ЛПС та NSE (LPS + NSE). * $p < 0.05$, ** - $p < 0.005$, *** - $p < 0.005$ у порівнянні з Контролем.

Таким чином, NSE запобігав патогенній дії ЛПС на мітохондрії мозку експериментальних тварин і підтримував їх когнітивні здібності. Аналогічні поліпшення були виявлені в іншій експериментальній моделі когнітивної патології, викликаній скополамином, і, отже, пов'язаної з мускариновими ацетилхоліновими рецепторами [253].

3.3.6. Дослідження впливу Аміксину і агматину на вивільнення цитохрому *c* під дією Ca^{2+} .

Препарати Аміксин та агматин широко використовуються в сучасній фармакології. Аміксин (тілорон) є індуктором інтерферону, який виявляє протимікробну, протигрибкову та протизапальну дію [254]. Агматин (4-амінобутил-гуанідин) є природним продуктом декарбоксилування аргініну і використовується для запобігання наслідків нервової ішемії, послаблення хронічного болю, як антидепресант, а також як біологічна добавка для спортсменів [255]. За літературними даними, обидва ці препарати здатні впливати на функціонування nAHP: Аміксин є агоністом $\alpha 7$ субтипу nAHP [256,257], а агматин - антагоністом та слабким каналним блокатором різних субтипів nAHP [258].

Метою цієї частини роботи було визначити, чи впливають агматин та Аміксин на мітохондрійні nAHP, зокрема, на вивільнення Цит С з мітохондрій печінки та мозку мишей під дією апоптогенних доз Ca^{2+} [259].

Як показано на Рис. 3.33, Аміксин знижував кількість Цит С, вивільненого під дією Ca^{2+} , але значно слабше, ніж $\alpha 7$ -специфічний агоніст PNU282987; при цьому він очевидно запобігав дії PNU282987: при сумісному застосуванні ефект PNU282987 зменшувався. Мітохондрії мозку виявились дещо більш чутливими до дії Аміксину, ніж мітохондрії печінки: в них Аміксин чинив більший ефект за мінімальної дози (0,05 мкМ) і значно ефективніше заважав дії PNU282987 (Рис 3.33).

Агматин теж запобігав вивільненню Цит С з мітохондрій під дією Ca^{2+} . Подібно до дії Аміксину, цей ефект був більш вираженим в мітохондріях мозку, де потужний вплив агматину спостерігався вже за мінімальної дози. При одночасному додаванні PNU282987 та агматину спостерігалось дозозалежне зменшення ефекту PNU282987 в мітохондріях як мозку, так і печінки (Рис. 3.34).

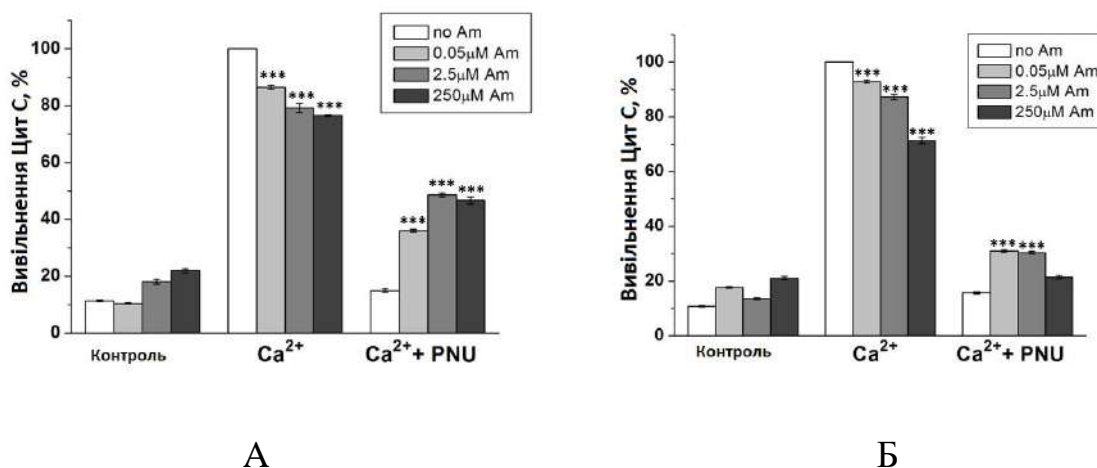


Рис 3.33. Вплив Аміксину (Am) на вивільнення Цит С мітохондріями мозку (А) та печінки (Б) мишей під дією 9 мкМ Ca^{2+} за присутності або у відсутності 30 нМ PNU282987 (PNU). *** - $p < 0.005$ порівняно з вивільненням Цит С без дії Аміксину (no Am). Дані нормалізовані щодо максимального вивільнення Цит С (без Аміксину), прийнятого за 100% ($n = 3$).

Таким чином, як Аміксин, так і агматин очевидно чинили слабкий проти-апоптичний ефект, знижуючи кількість Цит С, вивільненого із мітохондрій під дією Ca^{2+} . Обидва препарати ефективніше впливали на мітохондрії мозку, ніж печінки, і запобігали дії агоністу $\alpha 7$ nAHP PNU282987. Це непрямим чином свідчить про те, що вплив Аміксину і агматину на мітохондрії був опосередкований їх взаємодією з $\alpha 7$ nAHP.

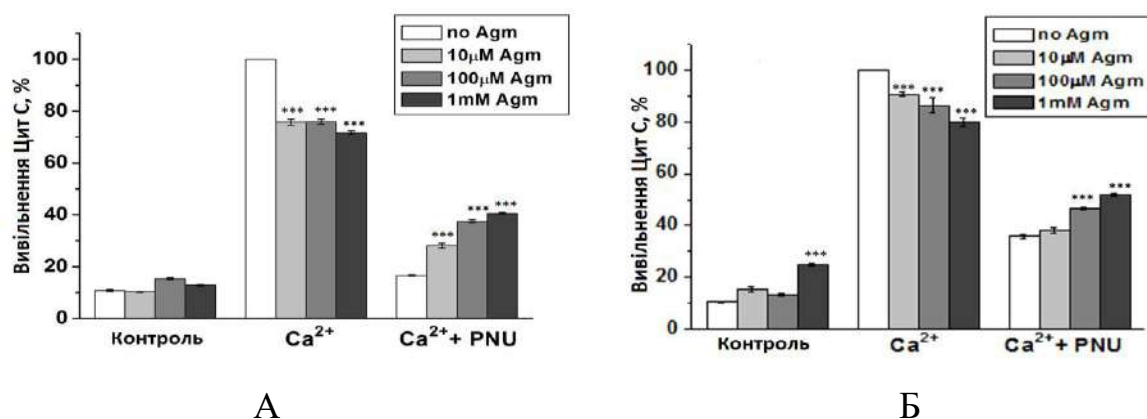


Рис. 3.34 . Вплив агматину (Agm) на вивільнення Цит С мітохондріями мозку (А) та печінки (Б) мишей під дією 9μМ Ca²⁺ за присутності або у відсутності 30 нМ PNU282987 (PNU). *** - $p < 0.005$ порівняно з вивільненням Цит С без дії агматину (no Agm). Дані нормалізовані щодо максимального вивільнення Цит С (без агматину), прийнятого за 100% ($n = 3$).

Мітохондрії мозку і печінки, вочевидь, не є ідентичними. Відомо, що вони відрізняються як своїми фізичними параметрами (гранулярністю), так і чутливістю до апоптогенної дії Ca²⁺ і H₂O₂. Це відповідає даним *Grancara et al.*, згідно яких, мітохондрії мозку є більш стійкими до оксидативного стресу, і утворення пори перехідної провідності в них відбувається за іншим механізмом, ніж в мітохондріях печінки [260]. Протективний вплив агматину на мітохондрії мозку був показаний раніше. Зокрема, було визначено, що агматин запобігав падінню електричного потенціалу мітохондрій мозку під дією Ca²⁺ [261] і знижував продукцію про-апоптотичних білків родини Bcl-2 та каспази-3 на рівні цілої клітини [262]. Автори віднесли цей ефект за рахунок нейтралізації агматином вільних радикалів кисню, які утворюються за дії Ca²⁺ і є чинниками формування пори перехідної провідності. За нашими даними, іншим шляхом впливу агматину на мітохондрії може бути його взаємодія з мітохондрійними НАХР, які регулюють утворення пори.

Агматин, як ендогенний метаболіт аргініну, транспортується в мітохондрії і, відповідно, здатний впливати на них за фізіологічних умов. Було показано, що агматин зв'язується з мітохондріями мозку більш ефективно, ніж

з мітохондріями печінки [263], що може пояснювати його потужніший вплив на мітохондрії мозку, показаний в наших експериментах. Крім того, різний вплив агматину на мітохондрії мозку і печінки можна пояснити неоднаковим субодиничним складом представлених на них нАХР. За нашими даними, мітохондрії печінки містили переважно $\alpha 7$ нАХР, в мітохондріях мозку значну частину складала також $\alpha 4\beta 2$ нАХР [161]. Відповідно, в мітохондріях мозку агматин, як антагоніст широкого спектру нАХР, чинив більш потужну дію, ніж в мітохондріях печінки.

Протективний ефект Аміксину на мітохондрії досліджений значно менше. В одній роботі показано радіопротекторний вплив тілорону, що може розцінюватись як захист клітин від апоптозу, стимульованого опромінюванням [264]. Інші автори показали, що похідні тілорону підвищували мембранний потенціал мітохондрій та їх стійкість до пошкоджуючих агентів [265], що узгоджується з нашими даними.

Отримані нами дані свідчать про те, що фармакологічна дія Аміксину та агматину може, поряд з іншими ефектами, включати вплив на функціонування мітохондрій, зокрема, на розвиток апоптозу за мітохондрійним шляхом. Характер такого впливу, вірогідно, залежить від наявності природних агоністів мітохондрійних нАХР, перш за все, холіну. За дефіциту холіну Аміксин і агматин мають підтримувати цілісність мітохондрій і сприяти виживанню клітин. За надлишку холіну, вони, навпаки, можуть запобігати його дії, полегшуючи апоптоз. Непрямим доказом такого механізму є визначена протипухлинна дія Аміксину [266] та агматину [267]: літературні дані свідчать про підвищений рівень холіну та його метаболітів в злоякісно трансформованих клітинах [268]. З іншого боку, ефективність впливу Аміксину і агматину на мітохондрійні нАХР вочевидь залежить від їх доступності в тканинах та всередині клітин. За літературними даними, Аміксин, введений внутрішньочеревно, накопичується переважно в печінці та селезінці [269], однак здатний проникати в мозок і безпосередньо впливати на внутрішньоклітинні процеси [270]. Агматин, за природних умов, синтезується

всередині клітин, а введений ззовні, здатний проникати в клітину шляхом активного перенесення системою транспорту путресцину [271].

Таким чином, Аміксин і агматин за фізіологічних умов здатні взаємодіяти з нАХР мітохондрій, які можуть бути однією з мішеней їх терапевтичної дії.

Роботи, в яких опубліковані основні наукові результати розділу

Статті:

✓ **Uspenska K**, Lykhmus O, Obolenska M, Pons S, Maskos U, Komisarenko S, Skok M. Mitochondrial nicotinic acetylcholine receptors support liver cells viability after partial hepatectomy. *Frontiers in Pharmacology*, 2018; 9, article 626:1-12.

✓ 5. Lykhmus O, **Uspenska K**, Koval L, Lytovchenko D, Voytenko L, Horid'ko T, Kosiakova H, Gula N, Komisarenko S, Skok M. N-stearoylethanolamine protects the brain and improves memory of mice treated with lipopolysaccharide or immunized with the extracellular domain of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Int Immunopharmacol*, 2017; 52:290-296.

✓ Lykhmus O, Mishra N, Koval L, Kalashnyk O, Gergalova G, **Uspenska K**, Komisarenko S, Soreq H, Skok M. Molecular Mechanisms Regulating LPS-Induced Inflammation in the Brain. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2016; 9(19): 1-13.

✓ **Uspenska KR**, Gergalova GL, Lykhmus OYu, Skok MV. The effect of amixin and agmatine on cytochrome c release from isolated mitochondria. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 2016; 88 (1): 5-10.

Тези:

○ **Середницька К.Р.**, Гергалова Г.Л., Лихмус О.Ю., Скок М.В. Препарати Аміксин та агматин впливають на функціонування нікотинного ацетилхолінового рецептора мітохондрій. XI з'їзд Українського біохімічного товариства (Київ, Україна, 2014). *Ukr.Biochem.J.*, 2014, Vol. 86, N5 (Suppl.2), p. 137.

○ **Успенська К.Р.**, Лихмус О.Ю. Субодичний склад та функціонування нікотинових ацетилхолінових рецепторів у мітохондріях мишей нокаутних за генами $\alpha 3$, $\alpha 7$, $\beta 2$ або $\beta 4$ субодичниць. «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016». Збірник тез доповідей, 2016, стор. 53.

○ Skok M., Lykhmus O., Koval L., **Uspenska K.**. The key role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in neuroinflammation and memory impairment. XVth International Symposium on Cholinergic Mechanisms. Abstract book, 16-20 October 2016, Maseille, France, p.35.

○ **Uspenska K.**, Lykhmus O., Skok M.. Functioning and physiological role of nicotinic acetylcholine receptors in mitochondria. Conference of Young Scientists. Ukr.Biochem.J. 2017, Vol. 89, N3, p.111.

○ **Uspenska K.**, Lykhmus O., Obolenska M., Maskos U., Skok M.. Mitochondrial nicotinic acetylcholine receptors: physiological value and mechanism of functioning. “Nicotinic Acetylcholine Receptors 2017”, Abstract book. 7-11 May 2017, Crete, Greece, p. S47.

○ **Uspenska K.R.**. Biological role of nicotinic acetylcholine receptors in mitochondria. FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference – Ukr. Biochem. J., 2018, Vol. 90, N 3, p. 106.

○ **Uspenska K.**, Lykhmus O., Skok M.V. Role of Mitochondrial Nicotinic Acetylcholine Receptors in Knock-Out Mice and after Partial Hepatectomy in Rats. “15TH HORIZONS IN MOLECULAR BIOLOGY” 10-13 September, 2018, Goettingen, Germany, Booklet p. 175.

УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА АНАЛІЗ РЕЗУЛЬТАТІВ

Раніше нікотинові ацетилхолінові рецептори (nAChR) традиційно розглядалися як ліганд-залежні іонні канали, що експресуються на поверхні клітини. У нервових та нервово-м'язових синапсах nAChR регулюють швидку синаптичну передачу та вивільнення нейротрансмітерів. nAChR нейронального типу також експресуються у багатьох незбудливих клітинах, де вони залучені до життєвоважливих функцій клітини: міграції, рухливості, адгезії, виживання тощо [1]. У лабораторії імунології клітинних рецепторів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України було показано, що функціонально активні nAChR локалізовані і всередині клітини - у зовнішній мембрані мітохондрій, де їх сигналювання не залежить від відкриття іонного каналу. Зв'язування як агоністів, так і антагоністів nAChR призводить до модуляції активності внутрішньомітохондрійних кіназ, що залучені до регуляції проникності зовнішньої мембрани мітохондрій, а від так до регуляції мітохондрійного шляху апоптозу [3, 4]. Таким чином, розуміння механізмів сигналювання мітохондрійних nAChR, а також їх модуляція з метою посилення виживання клітин може бути основою для пошуку нових терапевтичних підходів для підтримки життєздатності клітин при нейродегенеративних захворюваннях та інших патологіях, що супроводжуються активацією процесів апоптозу.

Для з'ясування відмінностей nAChR, що локалізовані у плазматичній мембрані клітин і у мітохондріях, та характеру пост-трансляційних модифікацій мітохондрійних nAChR було порівняно вуглеводні залишки у складі $\alpha 7$ субодниці nAChR, виділених з цих двох субклітинних компартментів. $\alpha 7$ субодниці nAChR мітохондрій не відрізнялися від nAChR плазматичної мембрани за вмістом N-ацетилглюкозаміну та галактози. Натомість, вміст сіалових кислот та фукози був вищий, а манози - нижчий у $\alpha 7$ nAChR мітохондрій порівняно з $\alpha 7$ nAChR плазматичної мембрани. Саме відмінність у складі вуглеводних залишків, які приєднуються у процесі пост-трансляційних модифікацій в апараті Гольджі (додаткове сіалування та фукозилування), може бути сигналом для направлення

молекул новосинтезованого nAChR до мітохондрій, а не до плазматичної мембрани.

Агоніст nAChR, нікотин, як ліпофільна сполука легко проникає через мембрани клітин, полегшує фолдинг та збирання nAChR у пентамери, а також посилює глікозилування протеїнів [29]. Вживання нікотину *per os* сприяло додатковому фукозилуванню мітохондрійних $\alpha 7$ субодиниць у печінці мишей і перерозподілу внутрішньоклітинних nAChR, особливо підтипу $\alpha 4\beta 2$, з яким здебільшого і пов'язують нікотинову залежність, на користь мітохондрій. Це ще раз підтвердило припущення, що збільшення вуглеводневих залишків може бути сигналом для направлення nAChR до мітохондрій. Однак в мітохондріях мишей, що вживали нікотин, $\alpha 7$ -специфічний агоніст (PNU-282987), $\alpha 7$ - та $\beta 2$ -специфічні позитивні алостеричні модулятори (PNU-120596 та dFBr, відповідно) менш ефективно пригнічували вивільнення Цит С, стимульоване Ca^{2+} або вортманіном, порівняно з мітохондріями контрольних мишей. Отримані дані свідчать про те, що вживання нікотину хоча і збільшувало кількість нікотинових рецепторів у мітохондріях, проте робило мітохондрійні nAChR менш чутливими до дії специфічних агоністів та алостеричних модуляторів, вірогідно, за рахунок надлишкового глікозилування.

Раніше вважалося, що у складі гетеромерних субтипів nAChR α -субодиниці забезпечують сигналювання рецепторів у відповідь на зв'язування ліганду, а β -субодиниці виконують виключно структурну функцію. Попередніми дослідженнями лабораторії імунології клітинних рецепторів було показано, що у мітохондріях експресуються декілька саме гетеромерних субтипів nAChR ($\alpha 7\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ та $\alpha 4\beta 2$), і вони можуть бути залучені до різних внутрішньомітохондрійних шляхів сигналювання з різною ефективністю [161]. В дисертаційній роботі, з використанням $\alpha 7$ - та $\beta 2$ -специфічних позитивних алостеричних модуляторів, було встановлено, що конформаційні зміни, викликані зв'язуванням лігандів у трансмембранному домені (переважно, між двома різними субодиницями), є достатніми для залучення до

сигналювання внутрішньомітохондрійних кіназ. Встановлено, що $\alpha 7$ субодиниця nAHR функціонально пов'язана з CaKMII, а $\beta 2$ – з PI_3K . Для сигналювання іншого субтипу nAHR - $\alpha 3\beta 4$ - зв'язування ліганду ((\pm)-18-MS) у трансмембранному сайті між двома різними субодиницями (між $\alpha 3$ та $\beta 4$) є більш потужним сигналом, ніж зв'язування ліганду ((+)-катарантину) між двома однаковими $\beta 4$ субодиницями. При цьому $\alpha 3\beta 4$ nAHR також зв'язаний з двома різними внутрішньомітохондрійними шляхами сигналювання: у першому випадку відбувається модуляція Src-залежного, а у другому - CaKMII-залежного шляху. Активація гетеромерних $\alpha 3\beta 4$ або $\alpha 7\beta 2$ nAHR запускає шляхи сигналювання від обох типів субодиниць і, таким чином, є більш ефективною порівняно з гомомерними рецепторами, наприклад $(\alpha 7)_5$ nAHR, у протидії апоптогенним стимулам.

Важливість кожної із субодиниць для сигналювання мітохондрійних nAHR, поставила питання про те, який вплив на стійкість мітохондрій буде мати відсутність однієї з субодиниць. Це було досліджено на моделі нокаутних мишей, в яких не експресуються окремі субодиниці nAHR. Було показано, що відсутність $\alpha 3$, $\alpha 7$ або $\beta 2$ субодиниць не суттєво знижує стійкість мітохондрій до дії Ca^{2+} завдяки компенсаторній експресії $\alpha 9$ та/або $\beta 4$ субодиниць nAHR. Вперше було показано, що у мітохондріях експресується гетеромерний $\alpha 9\beta 4$ субтип nAHR, який за відсутності $\alpha 7$ субодиниці, компенсує її зв'язок з CaKMII-залежним сигнальним шляхом, від так сприяючи стійкості мітохондрій до дії Ca^{2+} .

Вплив гетеромерних субтипів nAHR на різні сигнальні шляхи апоптозу забезпечує захист мітохондрій від апоптогенних чинників різної природи, що надзвичайно важливо для біологічних процесів, які потребують підвищеного виживання клітин. На моделі часткової гепатектомії було показано роль мітохондрійних nAHR під час фази ініціації регенерації печінки, коли синтез нових протеїнів ще не відбувається, але клітини стають більш стійкими до загибелі. Було виявлено, що через 3 години після часткової гепатектомії у

мітохондріях печінки підвищувався вміст $\alpha 3$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$ та $\beta 2$ субодиниць nAHR, при цьому мітохондрії вивільнювали менше Цит С за дії Ca^{2+} або H_2O_2 порівняно з доопераційним рівнем. Таким чином, підвищення рівнів $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 7\beta 2$ та $\alpha 9\alpha 10$ субтипів nAHR супроводжувалось збільшенням стійкості мітохондрій печінки до апоптогенних стимулів.

Відомо, що nAHR залучені до розвитку багатьох порушень нервової системи, які супроводжуються гострими або хронічними запальними процесами (хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона тощо). Показано, що нейрозапалення має негативний вплив на експресію та функціонування мітохондрійних nAHR мозку: вміст $\alpha 7$ субодиниць nAHR у мітохондріях мозку знижувався, а мітохондрії вивільняли більше Цит С при дії Ca^{2+} та ставали менш чутливими до впливу $\alpha 7$ -специфічного агоніста PNU282987, ніж мітохондрії контрольних тварин. Отримані нами дані показують, що мітохондрійні nAHR є чутливими до запалення, зниження їх кількості робить мітохондрії менш стійкими до апоптогенного впливу, що сприяє розвитку патологічних процесів у мозку. Вживання N-стероїлетаноламіну *per os* може запобігати патологічному ефекту нейрозапалення, покращувати когнітивний стан піддослідних мишей, в тому числі, стабілізуючи мітохондрії мозку. На моделі *in vitro* такі фармакологічні препарати, як аміксин та агматин, що зв'язуються неподалік ортостеричного сайту nAHR, також чинили слабкий проти-апоптогенний ефект на мітохондрії мозку та печінки, знижуючи кількість Цит С, що вивільнявся під дією апоптогенних доз Ca^{2+} .

Результати проведених досліджень показали, що nAHR, локалізовані у мітохондріях, представлені у гетеромерних комбінаціях субодиниць, що забезпечує зв'язок одного субтипу nAHR одночасно з декількома різними внутрішньомітохондрійними сигнальними шляхами. Це, в свою чергу, забезпечує ефективний захист клітин від апоптозу внаслідок відкриття мітохондрійної пори у відповідь на апоптогенні чинники різної природи.

Встановлено, що мітохондрійні нАХР відіграють суттєву роль у біологічних процесах, які потребують підвищеної виживаності клітин.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі, відповідно до мети та поставлених завдань, визначено один із можливих сигналів для направлення новосинтезованих nAHR до мітохондрій, досліджено сигнальні функції різних субодиниць nAHR та з'ясовано, як реагують мітохондрійні nAHR на вживання нікотину, запальні процеси або пошкодження, які потребують підвищеної виживаності клітин.

1. Мітохондрійні $\alpha 7$ nAHR, порівняно з $\alpha 7$ nAHR плазматичної мембрани, містять більше сіалових кислот та фукози, що може бути одним із сигналів для направлення nAHR до мітохондрій. Вживання нікотину збільшує фукозилування мітохондрійних $\alpha 7$ nAHR та сприяє їх направленню до мітохондрій, однак робить nAHR мітохондрій менш чутливими до дії специфічних лігандів.

2. $\alpha 3$, $\alpha 7$, $\beta 2$ та $\beta 4$ субодиниці nAHR функціонально пов'язані з різними внутрішньомітохондрійними кіназами. Сигналювання мітохондрійних nAHR є конформаційно-залежним і може бути стимульоване зв'язуванням позаклітинного ортостеричного або трансмембранного алостеричного сайту.

3. На моделі мишей, нокаутних за генами різних субодиниць nAHR, встановлено, що за відсутності певних субодиниць nAHR, стійкість мітохондрій до дії Ca^{2+} критично не знижується завдяки компенсаторній експресії $\alpha 9$ та/або $\beta 4$ субодиниць. Вперше показано наявність $\alpha 9\beta 4$ субтипу nAHR у мітохондріях.

4. Мітохондрійні nAHR є важливими для підтримки виживання клітин печінки після часткової гепатектомії. Через 3 години після ЧГЕ відбувається перерозподіл загального клітинного пулу nAHR на користь мітохондрій, що підвищує стійкість мітохондрій до дії апоптогенних чинників.

5. Нейрозапалення, навіть за короткочасної дії бактерійного ліпополісахариду, впливає на експресію мітохондрійних nAHR мозку, що

робить мітохондрії менш стійкими до апоптогенного впливу. Вживання N-стероїлетаноламіну запобігає патогенній дії ЛПС на мітохондрії мозку експериментальних тварин і підтримує їх когнітивні здібності.

б. Аміксин та агматин, зв'язуючись поблизу ортостеричного сайту $\alpha 7$ nAHR, чинять слабкий проти-апоптичний ефект, знижуючи кількість цитохрому *c*, вивільненого із мітохондрій під дією Ca^{2+} .

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Chernyavsky AI, Arredondo J, Vetter DE, Grando SA. Central role of $\alpha 9$ acetylcholine receptor in coordinating keratinocyte adhesion and motility at the initiation of epithelialization. *Exp Cell Res*. 2007;313(16):3542–55.
2. Resende RR, Adhikari A. Cholinergic receptor pathways involved in apoptosis, cell proliferation and neuronal differentiation. *Cell Communication and Signaling*. 2009.
3. Gergalova G, Lykhmus O, Kalashnyk O, Koval L, Chernyshov V, Kryukova E, et al. Mitochondria Express $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors to Regulate Ca^{2+} Accumulation and Cytochrome c Release: Study on Isolated Mitochondria. *PLoS One* [Internet]. 2012;7(2):e31361. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0031361>
4. Gergalova G, Lykhmus O, Komisarenko S, Skok M. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors control cytochrome c release from isolated mitochondria through kinase-mediated pathways. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2014;49(1):26–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2014.01.001>
5. Albuquerque, E. X., Pereira, E. F. R., Alkondon, M., Rogers SW. Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiol Rev*. 2009;89(1):73–120.
6. Nemezc Á, Prevost MS, Menny A, Corringer P-J. Emerging Molecular Mechanisms of Signal Transduction in Pentameric Ligand-Gated Ion Channels. *Neuron* [Internet]. 2016;90(3):452–70. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089662731630023X>
7. Cartaud J, Benedetti EL, Cohen JB, Meunier JC, Changeux JP. Presence of a lattice structure in membrane fragments rich in nicotinic receptor protein from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *FEBS Lett*. 1973;33(1):109–13.
8. Unwin N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J Mol Biol* [Internet]. 2005;346(4):967–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15701510>

9. Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Stowell M, Unwin N. Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: Transverse tunnels in the channel wall. *J Mol Biol.* 1999;288(4):765–86.
10. Smit AB, Syed NI, Schaap D, Van Minnen J, Klumperman J, Kits KS, et al. A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature.* 2001;411(6835):261–8.
11. Brejc K, van Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, van Der Oost J, Smit AB, et al. Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature [Internet].* 2001 [cited 2018 Mar 9];411:269–76. Available from: <http://www.rcsb.org/structure/1I9B>
12. Tillman TS, Alvarez FJD, Reinert NJ, Liu C, Wang D, Xu Y, et al. Functional Human $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor (nAChR) Generated from *Escherichia coli*. *J Biol Chem [Internet].* 2016;291(35):18276–82. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M116.729970>
13. Giniatullin R, Nistri A, Yakel JL. Desensitization of nicotinic ACh receptors: Shaping cholinergic signaling. Vol. 28, *Trends in Neurosciences.* 2005. p. 371–8.
14. Olsen JA, Balle T, Gajhede M, Ahring PK, Kastrup JS. Molecular recognition of the neurotransmitter acetylcholine by an acetylcholine binding protein reveals determinants of binding to nicotinic acetylcholine receptors. *PLoS One.* 2014;9(3).
15. Schraufstatter IU, DiScipio RG, Khaldoyanidi SK. Alpha 7 subunit of nAChR regulates migration of human mesenchymal stem cells. *J Stem Cells [Internet].* 2009;4(4):203–15. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20720594
16. Elgoyhen AB, Katz E. The efferent medial olivocochlear-hair cell synapse. *J Physiol Paris.* 2012;106(1–2):47–56.
17. Romanelli MN, Gratteri P, Guandalini L, Martini E, Bonaccini C, Gualtieri F. Central nicotinic receptors: Structure, function, ligands, and therapeutic potential. Vol. 2, *ChemMedChem.* 2007. p. 746–67.
18. Michele Zoli, Susanna Pucci, Antonietta Vilella CG. Neuronal and

- Extraneuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Curr Neuropharmacol*. 2017;15:1–11.
19. Galzi J I., Changeux J p. Neuronal nicotinic receptors: Molecular organization and regulations. Vol. 34, *Neuropharmacology*. 1995. p. 563–82.
20. Plazas P V, Katz E, Gomez-Casati ME, Bouzat C, Elgoyhen AB. Stoichiometry of the $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic cholinergic receptor. *J Neurosci* [Internet]. 2005;25(47):10905–12.
21. Corradi J, Bouzat C. Understanding the Bases of Function and Modulation of $\alpha 7$ Nicotinic Receptors: Implications for Drug Discovery. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2016;90(3):288–99.
22. Numa S. Molecular basis for the function of ionic channels. *Biochem Soc Symp* [Internet]. 1986;52:119–43.
23. Grutter T, Changeux JP. Nicotinic receptors in wonderland. Vol. 26, *Trends in Biochemical Sciences*. 2001. p. 459–63.
24. Kabbani N, Nordman JC, Corgiat B a, Veltri DP, Shehu A, Seymour V a, et al. Are nicotinic acetylcholine receptors coupled to G proteins? *Bioessays* [Internet]. 2013;35(12):1025–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24185813>
25. King JR, Nordman JC, Bridges SP, Lin MK, Kabbani N. Identification and characterization of a G protein-binding cluster in $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem*. 2015;290(33):20060–70.
26. De Jonge WJ, Ulloa L. The $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. Vol. 151, *British Journal of Pharmacology*. 2007. p. 915–29.
27. Báez-Pagán CA, Delgado-Vélez M, Lasalde-Dominicci JA. Activation of the Macrophage $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor and Control of Inflammation. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2015;10(3):468–76.
28. Egea J, Buendia I, Parada E, Navarro E, León R, Lopez MG. Anti-inflammatory role of microglial $\alpha 7$ nAChRs and its role in neuroprotection. Vol. 97, *Biochemical Pharmacology*. 2015. p. 463–72.

29. Sallette J, Pons S, Devillers-Thiery A, Soudant M, De Carvalho LP, Changeux JP, et al. Nicotine upregulates its own receptors through enhanced intracellular maturation. *Neuron*. 2005;46(4):595–607.
30. Devreotes PN, Gardner JM, Fambrough DM. Kinetics of biosynthesis of acetylcholine receptor and subsequent incorporation into plasma membrane of cultured chick skeletal muscle. *Cell* [Internet]. 1977 Mar [cited 2018 Mar 9];10(3):365–73. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/009286747790023X>
31. Zhou Z, Liu YC, Chen XM, Li FQ, Tong XJ, Ding YP, et al. Treatment of experimental non-alcoholic steatohepatitis by targeting $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor-mediated inflammatory responses in mice. *Mol Med Rep*. 2015;
32. Soeda J, Morgan M, McKee C, Mouralidarane A, Lin CI, Roskams T, et al. Nicotine induces fibrogenic changes in human liver via nicotinic acetylcholine receptors expressed on hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;
33. Colquhoun D, Unwin N, Shelley C, Hatton C, Sivilotti L. Nicotinic acetylcholine receptors. *Burger's Med Chem Vol II Drug Discov Drug Dev*. 2003;2(1):357–405.
34. OMIM® - Online Mendelian Inheritance in Man® [Internet]. CHOLINERGIC RECEPTOR, NEURONAL NICOTINIC, ALPHA POLYPEPTIDE 6; CHRNA6. Available from: <https://www.omim.org/entry/606888?search=CHRNA6&highlight=chrna6>
35. OMIM® - Online Mendelian Inheritance in Man® [Internet]. CHOLINERGIC RECEPTOR, NEURONAL NICOTINIC, ALPHA POLYPEPTIDE 9; CHRNA9. Available from: <https://www.omim.org/entry/605116?search=CHRNA9&highlight=chrna9>
36. Levey MS, Jacob MH. Changes in the regulatory effects of cell-cell interactions on neuronal AChR subunit transcript levels after synapse formation. *J Neurosci* [Internet]. 1996;16(21):6878–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8824326>
37. Olson EN, Glaser L, Merlie JP. ?? and ?? subunits of the nicotinic

acetylcholine receptor contain covalently bound lipid. *J Biol Chem.* 1984;259(9):5364–7.

38. Kloog Y, Flynn D, Hoffman AR, Axelrod J. Enzymatic carboxymethylation of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1980;97(4):1474–80.

39. Vandlen RL, Wu WCS, Eisenach JC, Raftery MA, Vandlen RL. Studies of the Composition of Purified *Torpedo californica* Acetylcholine Receptor and of Its Subunits. *Biochemistry.* 1979;18(10):1845–54.

40. Gehle VM, Walcott EC, Nishizaki T, Sumikawa K. N-Glycosylation at the conserved sites ensures the expression of properly folded functional ACh receptors. *Mol Brain Res.* 1997;45(2):219–29.

41. Govind AP, Walsh H, Green WN. Nicotine-Induced Upregulation of Native Neuronal Nicotinic Receptors Is Caused by Multiple Mechanisms. *J Neurosci* [Internet]. 2012;32(6):2227–38. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.5438-11.2012>

42. Blount P, Merlie JP. Mutational analysis of muscle nicotinic acetylcholine receptor subunit assembly. *J Cell Biol* [Internet]. 1990;111(6 Pt 1):2613–22. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2116424&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

43. Bourne Y, Talley TT, Hansen SB, Taylor P, Marchot P. Crystal structure of a Cbtx-AChBP complex reveals essential interactions between snake α -neurotoxins and nicotinic receptors. *EMBO J.* 2005;24(8):1512–22.

44. Corringer PJ, Bertrand S, Galzi JL, Devillers-Thiéry a, Changeux JP, Bertrand D. Mutational analysis of the charge selectivity filter of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron.* 1999;

45. Grant GA, Luetje CW, Summers R, Xu XL. Differential roles for disulfide bonds in the structural integrity and biological activity of kappa-Bungarotoxin, a neuronal nicotinic acetylcholine receptor antagonist. *Biochemistry* [Internet]. 1998;37(35):12166–71. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9724529>

46. Hurst R, Rollema H, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors: From basic science to therapeutics. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2013;137(1):22–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.08.012>

47. Paterson D, Nordberg A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. Vol. 61, *Progress in Neurobiology*. 2000. p. 75–111.

48. Guo T, Yang C, Guo L, Liu K. A comparative study of the effects of ABT-418 and methylphenidate on spatial memory in an animal model of ADHD. *Neurosci Lett*. 2012;528(1):11–5.

49. Rowbotham MC, Rachel Duan W, Thomas J, Nothaft W, Backonja MM. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial evaluating the efficacy and safety of ABT-594 in patients with diabetic peripheral neuropathic pain. *Pain*. 2009;146(3):245–52.

50. Lebbe EKM, Peigneur S, Wijesekara I, Tytgat J. Conotoxins Targeting nicotinic acetylcholine receptors: An overview. Vol. 12, *Marine Drugs*. 2014. p. 2970–3004.

51. Gill JK, Dhankher P, Sheppard TD, Sher E, Millar NS. A Series of 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Allosteric Modulators with Close Chemical Similarity but Diverse Pharmacological Properties. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2012;81(5):710–8. Available from: <http://molpharm.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/mol.111.076026>

52. A.A. P, J.L. Y. Effects of neuronal nicotinic acetylcholine receptor allosteric modulators in animal behavior studies [Internet]. Vol. 86, *Biochemical Pharmacology*. 2013. p. 1054–62. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed11&NEWS=N&AN=2013650856>

53. No Title [Internet]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02978599?term=positive+allosteric+modulator&rank=3>

54. Wu J, Liu Q, Tang P, Mikkelsen JD, Shen J, Whiteaker P, et al. Heteromeric $\alpha 7\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Brain. Vol. 37, *Trends in*

Pharmacological Sciences. 2016. p. 562–74.

55. Zoli M, Léna C, Picciotto MR, Changeux JP. Identification of four classes of brain nicotinic receptors using beta2 mutant mice. *J Neurosci* [Internet]. 1998;18(12):4461–72. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9614223>

56. Colombo SF, Mazzo F, Pistillo F, Gotti C. Biogenesis, trafficking and up-regulation of nicotinic ACh receptors. Vol. 86, *Biochemical Pharmacology*. 2013. p. 1063–73.

57. Quick MW, Ceballos RM, Kasten M, McIntosh JM, Lester RAJ. $\alpha 3\beta 4$ subunit-containing nicotinic receptors dominate function in rat medial habenula neurons. *Neuropharmacology*. 1999;38(6):769–83.

58. Freedman R, Olincy A, Buchanan RW, Harris JG, Gold JM, Johnson L, et al. Initial phase 2 trial of a nicotinic agonist in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2008;165(8):1040–7.

59. Toyohara J, Hashimoto K. $\alpha 7$ nicotinic receptor agonists: Potential therapeutic drugs for treatment of cognitive impairments in schizophrenia and Alzheimer's disease. *Open Med Chem J* [Internet]. 2010;4(SPEC. ISSUE 1):37–56. Available from:

<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77954584878&partnerID=40&md5=b34ef76fb95ef6245639991f251394f3>

60. Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2015 Apr;14(4):388–405.

61. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung Y-C, Quinlan M, Wisniewski H, Binder L. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein? (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Alzheimer Dis Assoc Disord* [Internet]. 1987;1(3):202.

62. Mufson EJ, Counts SE, Perez SE, Ginsberg SD. Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: Therapeutic implications. Vol. 8, *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2008. p. 1703–18.

63. Warpman U, Nordberg A. Epibatidine and ABT 418 reveal selective losses of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors in alzheimer brains. *Neuroreport*. 1995;6(17):2419–23.

64. Sabbagh MN, Reid RT, Corey-Bloom J, Rao TS, Hansen LA, Alford M, et al. Correlation of nicotinic binding with neurochemical markers in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 1998;105(6–7):709–17.
65. Kim SH, Kim YK, Jeong SJ, Haass C, Kim YH, Suh YH. Enhanced Release Of Secreted Form Of Alzheimers Amyloid Precursor Protein From Pc12 Cells By Nicotine. *Mol Pharmacol*. 1997;52(3):430–6.
66. Nakamura S, Takahashi T, Yamashita H, Kawakami H. Nicotinic acetylcholine receptors and neurodegenerative disease. In: *Alcohol*. 2001. p. 79–81.
67. Wang HY, Lee DH, Davis CB, Shank RP. Amyloid peptide A β (1-42) binds selectively and with picomolar affinity to α 7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem* [Internet]. 2000;75(3):1155–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10936198>
68. Pettit DL, Shao Z, Yakel JL. beta-Amyloid(1-42) peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice. *J Neurosci*. 2001;21(1):RC120.
69. Gopalakrishnan SM, Philip BM, Gronlien JH, Malysz J, Anderson DJ, Gopalakrishnan M, et al. Functional characterization and high-throughput screening of positive allosteric modulators of α 7 nicotinic acetylcholine receptors in IMR-32 neuroblastoma cells. *Assay Drug Dev Technol*. 2011;9(6):635–45.
70. Williams DK, Wang J, Papke RL. Positive allosteric modulators as an approach to nicotinic acetylcholine receptor-targeted therapeutics: Advantages and limitations. In: *Biochemical Pharmacology*. 2011. p. 915–30.
71. Wang H-Y, Stucky A, Liu J, Shen C, Trocme-Thibierge C, Morain P. Dissociating β -amyloid from α 7 nicotinic acetylcholine receptor by a novel therapeutic agent, S 24795, normalizes α 7 nicotinic acetylcholine and NMDA receptor function in Alzheimer's disease brain. *J Neurosci* [Internet]. 2009;29(35):10961–73.
72. Bezard E, Brotchie JM, Gross CE. Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(8):577–88.
73. C.W. O. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease [Internet]. Vol. 22, *Annual Review of Neuroscience*. 1999. p. 123–44.

74. Büeler H. Mitochondrial dynamics, cell death and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Apoptosis*. 2010;15(11):1336–53.
75. Hernán MA, Zhang SM, Rueda-deCastro AM, Colditz GA, Speizer FE, Ascherio A. Cigarette smoking and the incidence of Parkinson's disease in two prospective studies. *Ann Neurol [Internet]*. 2001;50(6):780–6.
76. Li X, Li W, Liu G, Shen X, Tang Y. Association between cigarette smoking and Parkinson's disease: A meta-analysis. *Arch Gerontol Geriatr*. 2015;61(3):510–6.
77. Lange KW, Wells FR, Jenner P, Marsden CD. Altered Muscarinic and Nicotinic Receptor Densities in Cortical and Subcortical Brain Regions in Parkinson's Disease. *J Neurochem*. 1993;60(1):197–203.
78. Helbig I, Lowenstein DH. Genetics of the epilepsies: Where are we and where are we going? Vol. 26, *Current Opinion in Neurology*. 2013. p. 179–85.
79. Turski L, Ikonomidou C, Turski WA, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. Review: Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: A novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse*. 1989;3(2):154–71.
80. Dani JA. Properties underlying the influence of nicotinic receptors on neuronal excitability and epilepsy. *Epilepsia*. 2000;41(8):1063–5.
81. Chen Z, Wang L, Wang C, Chen Q, Zhai Q, Guo Y, et al. Mutational analysis of CHRN2, CHRNA2 AND CHRNA4 genes in chinese population with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(6):9063–70.
82. Chen T, Giri M, Xia Z, Subedi YN LY. Genetic and epigenetic mechanisms of epilepsy: a review. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2017;13:1841–1859.
83. Scheffer IE, Bhatia KP, Lopes-Cendes I, Fish DR, Marsden CD, Andermann E, et al. Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Brain [Internet]*. 1995;118(1):61–73. Available from: <http://brain.oxfordjournals.org/content/118/1/61.abstract>
84. Leniger T, Kananura C, Hufnagel A, Bertrand S, Bertrand D, Steinlein OK. A new Chrna4 mutation with low penetrance in nocturnal frontal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2003;44(7):981–5.
85. Ghasemi M, Hadipour-Niktarash A. Pathologic role of neuronal nicotinic

acetylcholine receptors in epileptic disorders: Implication for pharmacological interventions. *Rev Neurosci*. 2015;26(2):199–223.

86. Tolbert D, Cloyd J, Biton V, Bekersky I, Walzer M, Wesche D, et al. Bioequivalence of oral and intravenous carbamazepine formulations in adult patients with epilepsy. *Epilepsia*. 2015;56(6):915–23.

87. Wang Y, Zhang H nian, Niu C he, Gao P, Chen Y jun, Peng J, et al. Population pharmacokinetics modeling of oxcarbazepine to characterize drug interactions in Chinese children with epilepsy. *Acta Pharmacol Sin*. 2014;35(10):1342–50.

88. Wong AHC, Van Tol HHM. Schizophrenia: From phenomenology to neurobiology. Vol. 27, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2003. p. 269–306.

89. De Leon J, Diaz FJ. A meta-analysis of worldwide studies demonstrates an association between schizophrenia and tobacco smoking behaviors. *Schizophr Res*. 2005;76(2–3):135–57.

90. Olincy A, Young DA, Freedman R. Increased levels of the nicotine metabolite cotinine in schizophrenic smokers compared to other. *Biol Psychiatry*. 1997;42(1):1–5.

91. Freedman R, Hall M, Adler LE, Leonard S. Evidence in postmortem brain tissue for decreased numbers of hippocampal nicotinic receptors in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 1995;38(1):22–33.

92. Guan ZZ, Zhang X, Blennow K, Nordberg A. Decreased protein level of nicotinic receptor $\alpha 7$ subunit in the frontal cortex from schizophrenic brain. *Neuroreport*. 1999;10(8):1779–82.

93. Mukherjee S, Mahadik SP, Korenovsky A, Laev H, Schnur DB, Reddy R. Serum antibodies to nicotinic acetylcholine receptors in schizophrenic patients. *Schizophr Res*. 1994;12(2):131–6.

94. Müller N, Weidinger E, Leitner B, Schwarz MJ. The role of inflammation in schizophrenia. *Frontiers in Neuroscience*. 2015.

95. Thomas R, Cavanna AE. The pharmacology of Tourette syndrome. In: *Journal of Neural Transmission*. 2013. p. 689–94.

96. Sanberg PR, McConville BJ, Fogelson HM, Manderscheid PZ, Parker KW,

Blythe MM, et al. Nicotine potentiates the effects of haloperidol in animals and in patients with Tourette syndrome. *Biomed Pharmacother.* 1989;43(1):19–23.

97. McConville BJ, Fogelson MH, Norman AB, Klykylo WM, Manderscheid PZ, Parker KW, et al. Nicotine potentiation of haloperidol in reducing tic frequency in Tourette's disorder. In: *American Journal of Psychiatry.* 1991. p. 793–4.

98. Sanberg PR, Vindrola-Padros C, Shytle RD. Translating laboratory discovery to the clinic: From nicotine and mecamylamine to Tourette's, depression, and beyond. Vol. 107, *Physiology and Behavior.* 2012. p. 801–8.

99. Shytle RD, Silver AA, Sanberg PR. Comorbid bipolar disorder in Tourette's syndrome responds to the nicotinic receptor antagonist mecamylamine (Inversine). *Biol Psychiatry.* 2000;48(10):1028–31.

100. Kubera M, Obuchowicz E, Goehler L, Brzeszcz J, Maes M. In animal models, psychosocial stress-induced (neuro)inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry.* 2011.

101. Janowsky DS, Risch SC. Cholinomimetic and anticholinergic drugs used to investigate an acetylcholine hypothesis of affective disorders and stress. *Drug Dev Res [Internet].* 1984;4(2):125–42.

102. Anda RF, Williamson DF, Escobedo LG, Mast EE, Giovino GA, Remington PL, et al. Depression and the Dynamics of Smoking. *JAMA [Internet].* 1990;264(12):1541.

103. Labbate LA. Nicotine cessation, mania, and depression [1]. Vol. 149, *American Journal of Psychiatry.* 1992. p. 708.

104. Decker MW, Brioni JD, Sullivan JP, Buckley MJ, Radek RJ, Raszkiewicz JL, et al. (S)-3-methyl-5-(1-methyl-2-pyrrolidinyloxy)isoxazole (ABT 418): a novel cholinergic ligand with cognition-enhancing and anxiolytic activities: II. In vivo characterization. *J Pharmacol Exp Ther [Internet].* 1994;270(1):319–28. 7

105. Altmann R. *Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen*. Veit, Leipzig. 1890;

106. Benda C. *Über die Spermatogenese.* *Arch Anal Physiol.* 1898;393–8.

107. Palade GE. No Title. *Proc Nall Acad Sci USA* . 1964;52:613–34.
108. Lane N, Martin W. The energetics of genome complexity. *Nature*. 2010;467(7318):929–34.
109. Cooper GM, Hausman RE. *The Cell: A Molecular Approach*. Sinauer Associates. 2007. 1-820 p.
110. Karnkowska A, Vacek V, Zubáčová Z, Treitli SC, Petrželková R, Eme L, et al. A eukaryote without a mitochondrial organelle. *Curr Biol*. 2016;26(10):1274–84.
111. Horvath SE, Daum G. Lipids of mitochondria. *Prog Lipid Res*. 2013;52(4):590–614.
112. Comte J, Maïsterrena B, Gautheron DC. Lipid composition and protein profiles of outer and inner membranes from pig heart mitochondria. Comparison with microsomes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 1976;419(2):271–84.
113. Jun;108(6):2233-40 RA (University of HJCB 1989. No Title.
114. Van Haute L, Pearce SF, Powell CA, D’Souza AR, Nicholls TJ, Minczuk M. Mitochondrial transcript maturation and its disorders. *J Inherit Metab Dis*. 2015;38(4):655–80.
115. Meyer JN, Leuthner TC, Luz AL. Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity. *Toxicology*. 2017;391:42–53.
116. van der Blik AM, Shen Q, Kawajiri S. Mechanisms of Mitochondrial Fission and Fusion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2013;5(6):a011072–a011072.
117. Song Z, Ghochani M, McCaffery JM, Frey TG, Chan DC. Mitofusins and OPA1 Mediate Sequential Steps in Mitochondrial Membrane Fusion. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2009;20(15):3525–32.
118. Dalmaso G, Zapata PAM, Brady NR, Hamacher-Brady A. Agent-based modeling of mitochondria links sub-cellular dynamics to cellular homeostasis and heterogeneity. *PLoS One*. 2017;12(1).
119. Cai Q, Sheng ZH. Moving or Stopping Mitochondria: Miro as a Traffic Cop by Sensing Calcium. Vol. 61, *Neuron*. 2009. p. 493–6.
120. Cai Q, Sheng ZH. Mitochondrial transport and docking in axons. Vol. 218, *Experimental Neurology*. 2009. p. 257–67.

121. J. F. R. KERR* AHWAARCurrie. APOPTOSIS: A BASIC BIOLOGICAL PHENOMENON WITH WIDE- RANGING IMPLICATIONS IN TISSUE KINETICS. *J Intern Med.* 1972;258(6):479–517.
122. Horvitz HR. Genetic Control of Programmed Cell Death in the Nematode *Caenorhabditis elegans* Genetic Control of Programmed Cell Death in the Nematode. *Cancer Res.* 1999;44(6):213–22.
123. Hientz K, Mohr A, Bhakta-Guha D, Efferth T. The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. *Oncotarget* [Internet]. 2017;8(5). Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/13475>
124. Gruver-Yates A, Cidlowski J. Tissue-Specific Actions of Glucocorticoids on Apoptosis: A Double-Edged Sword. *Cells* [Internet]. 2013;2(2):202–23. Available from: <http://www.mdpi.com/2073-4409/2/2/202/>
125. Yi F, Frazzette N, Cruz AC, Klebanoff CA, Siegel RM. Beyond Cell Death: New Functions for TNF Family Cytokines in Autoimmunity and Tumor Immunotherapy. Vol. 24, *Trends in Molecular Medicine.* 2018. p. 642–53.
126. Martinez-Caballero S, Dejean LM, Kinnally MS, Oh KJ, Mannella CA, Kinnally KW. Assembly of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC. *J Biol Chem.* 2009;284(18):12235–45.
127. Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. Vol. 7, *Cell Death and Differentiation.* 2000. p. 1166–73.
128. Halestrap AP. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2006;34(2):232.
129. Broekemeier KM, Dempsey ME, Pfeiffer DR. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J Biol Chem.* 1989;264(14):7826–30.
130. Bernardi P, Forte M. The mitochondrial permeability transition pore. *Novartis Found Symp* [Internet]. 2007;287:157–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=C>

itation&list_uids=18074637

131. Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? *Front Physiol* [Internet]. 2013;4:95.
132. He J, Ford HC, Carroll J, Ding S, Fearnley IM, Walker JE. Persistence of the mitochondrial permeability transition in the absence of subunit c of human ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(13).
133. Shanmughapriya S, Rajan S, Hoffman NE, Higgins AM, Tomar D, Nemani N, et al. SPG7 Is an Essential and Conserved Component of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *Mol Cell*. 2015;60(1):47–62.
134. Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molkentin JD. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol*. 2007;9(5):550–5.
135. Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, et al. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*. 2004;427(6973):461–5.
136. Kwong JQ, Molkentin JD. Physiological and Pathological Roles of the Mitochondrial Permeability Transition Pore in the Heart. Vol. 21, *Cell Metabolism*. 2015. p. 206–14.
137. Biasutto L, Azzolini M, Szabò I, Zoratti M. The mitochondrial permeability transition pore in AD 2016: An update. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2016;1863(10):2515–30.
138. Benz R. Biophysical properties of porin pores from mitochondrial outer membrane of eukaryotic cells. Vol. 46, *Experientia*. 1990. p. 131–7.
139. Malia TJ, Wagner G. NMR structural investigation of the mitochondrial outer membrane protein VDAC and its interaction with antiapoptotic Bcl-XL. *Biochemistry*. 2007;46(2):514–25.
140. Gupta R, Ghosh S. Phosphorylation of voltage-dependent anion channel by c-Jun N-terminal Kinase-3 leads to closure of the channel. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;459(1):100–6.
141. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that

promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000;102(1):33–42.

142. Van Loo G, Saelens X, Van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenabeele P. The role of mitochondrial factors in apoptosis: A Russian roulette with more than one bullet. Vol. 9, *Cell Death and Differentiation*. 2002. p. 1031–42.

143. Chinnaiyan AM. The Apoptosome: Heart and Soul of the Cell Death Machine. *Neoplasia* [Internet]. 1999;1(1):5–15.

144. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495–516.

145. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol*. 2013;14(1).

146. Cory S, Adams JM. The BCL2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. Vol. 2, *Nature Reviews Cancer*. 2002. p. 647–56.

147. Kinnally KW, Antonsson B. A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. Vol. 12, *Apoptosis*. 2007. p. 857–68.

148. Guo L, Pietkiewicz D, Pavlov E V, Grigoriev SM, Kasianowicz JJ, Dejean LM, et al. Effects of cytochrome c on the mitochondrial apoptosis-induced channel MAC. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2004;286(5):C1109-17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15075210>

149. Kluck RM. The Release of Cytochrome c from Mitochondria: A Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis. *Science* (80-) [Internet]. 1997;275(5303):1132–6.

150. Cosulich SC, Worrall V, Hedge PJ, Green S, Clarke PR. Regulation of apoptosis by BH3 domains in a cell-free system. *Curr Biol*. 1997;7(12):913–20.

151. Joza N, Susin S a, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. 2001;410(6828):549–54.

152. Lukas RJ. Detection of low-affinity alpha-bungarotoxin binding sites in the rat central nervous system. *Biochemistry* [Internet]. 1984;23(6):1160–4.

153. Kyriatsoulis A, Manns M, Gerken G, Lohse AW, Maelicke A, Wessler I, et al.

Immunochemical characterization of anti-acetylcholine receptor antibodies in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol.* 1988;6(3):283–90.

154. Fabian-Fine R, Skehel P, Errington ML, Davies H a, Sher E, Stewart MG, et al. Ultrastructural Distribution of the $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit in Rat Hippocampus. *J Neurosci* [Internet]. 2001;21(20):7993–8003.

155. Li Y, Meyer EM, Walker DW, Millard WJ, He YJ, King M a. Alpha7 nicotinic receptor activation inhibits ethanol-induced mitochondrial dysfunction, cytochrome c release and neurotoxicity in primary rat hippocampal neuronal cultures. *J Neurochem* [Internet]. 2002;81(4):853–8.

156. Saxena G, Patro IK, Nath C. ICV STZ induced impairment in memory and neuronal mitochondrial function: A protective role of nicotinic receptor. *Behav Brain Res.* 2011;224(1):50–7.

157. Wang YY, Liu Y, Ni XY, Bai ZH, Chen QY, Zhang YE, et al. Nicotine promotes cell proliferation and induces resistance to cisplatin by $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor-mediated activation in Raw264.7 and E14 cells. *Oncol Rep.* 2014;31(3):1480–8.

158. Garrido R, Mattson MP, Hennig B, Toborek M. Nicotine protects against arachidonic-acid-induced caspase activation, cytochrome c release and apoptosis of cultured spinal cord neurons. *J Neurochem.* 2001;76(5):1395–403.

159. Kalashnyk OM, Gergalova GL, Komisarenko SV, Skok MV. Intracellular localization of nicotinic acetylcholine receptors in human cell lines. *Life Sci* [Internet]. 2012;91(21–22):1033–7.

160. Colombini M. VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol Cell Biochem.* 2004;256–257(1–2):107–15.

161. Lykhmus O, Gergalova G, Koval L, Zhmak M, Komisarenko S, Skok M. Mitochondria express several nicotinic acetylcholine receptor subtypes to control various pathways of apoptosis induction. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;53:246–52.

162. Chernyavsky A, Chen Y, Wang PH, Grando SA. Pemphigus vulgaris antibodies target the mitochondrial nicotinic acetylcholine receptors that protect keratinocytes from apoptolysis. *Int Immunopharmacol.* 2015;29(1):76–80.

163. Chernyavsky AI, Shchepotin IB, Grando SA. Mechanisms of growth-promoting and tumor-protecting effects of epithelial nicotinic acetylcholine receptors. *Int Immunopharmacol*. 2015;29(1):36–44.
164. Orr-Urtreger A, Göldner FM, Saeki M, Lorenzo I, Goldberg L, De Biasi M, et al. Mice deficient in the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor lack alpha-bungarotoxin binding sites and hippocampal fast nicotinic currents. *J Neurosci* [Internet]. 1997;17(23):9165–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9364063>
165. Xu W, Orr-Urtreger A, Nigro F, Gelber S, Sutcliffe CB, Armstrong D, et al. Multiorgan autonomic dysfunction in mice lacking the b2 and the b4 subunits of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* [Internet]. 1999;19(21):9298–305.
166. Xu W, Gelber S, Orr-Urtreger A, Armstrong D, Lewis RA, Ou CN, et al. Megacystis, mydriasis, and ion channel defect in mice lacking the alpha3 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. 1999;96(10):5746–51.
167. Lykhmus O, Koval L, Pavlovych S, Zouridakis M, Zisimopoulou P, Tzartos S, et al. Functional effects of antibodies against non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Immunol Lett*. 2010;128(1):68–73.
168. Skok M V., Voitenko LP, Voitenko S V., Lykhmus EY, Kalashnik EN, Litvin TI, et al. Alpha subunit composition of nicotinic acetylcholine receptors in the rat autonomic ganglia neurons as determined with subunit-specific anti-alpha(181-192) peptide antibodies. *Neuroscience*. 1999;93(4):1427–36.
169. Koval L, Lykhmus O, Zhmak M, Khruschov A, Tsetlin V, Magrini E, et al. Differential involvement of $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$ and $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors in B lymphocyte activation in vitro. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2011;43(4):516–24.
170. Koval OM, Voitenko LP, Skok M V., Lykhmus EY, Tsetlin VI, Zhmak MN, et al. The β -subunit composition of nicotinic acetylcholine receptors in the neurons of the guinea pig inferior mesenteric ganglion. *Neurosci Lett*. 2004;365(2):143–6.

171. Lips KS, Pfeil U, Kummer W. Coexpression of $\alpha 9$ and $\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* [Internet]. 2002;115(1):1–5.
172. Harlow D, Lane E. *A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1988. 28-29 p.
173. Higgins GM AR. Experimental pathology of the liver – Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol*. 1931;12:186–202.
174. Tannuri ACA, Tannuri U, Coelho MC, Santos NA dos, Mello ES de. Experimental models of hepatectomy and liver regeneration using newborn and weaning rats. *Clinics* [Internet]. 2007;62(6):757–62. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1807-59322007000600016&lng=en&nrm=iso&tlng=en
175. Berdyshev AG, Kosiakova H V., Onopchenko O V., Panchuk RR, Stoika RS, Hula NM. N-Stearoylethanolamine suppresses the pro-inflammatory cytokines production by inhibition of NF- κ B translocation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2015;121:91–6.
176. Biology C, Poulter L, Earnest JP, Stroud RM, Burlingame a L. Structure, oligosaccharide structures, and posttranslationally modified sites of the nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1989;86(17):6645–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=297901&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
177. Krisanova N V., Triakash IO, Borisova TA. Synaptopathy under conditions of altered gravity: Changes in synaptic vesicle fusion and glutamate release. *Neurochem Int*. 2009;55(8):724–31.
178. Van Damme EJM, Lannoo N, Peumans WJ. *Plant Lectins* [Internet]. Vol. 48, *Advances in Botanical Research*. 2008. 107-209 p.
179. Lodish H, Berk A, Zipursky S, Al E. Glycosylation in the ER and Golgi Complex. *Mol Cell Biol*. 2000;(4):section 17.7.
180. Asgary S, Naderi GH, Sarrafzadegan N, Gharypur M. In vitro effect of nicotine

and cotinine on the susceptibility of LDL oxidation and hemoglobin glycosylation. *Mol Cell Biochem.* 2003;246(1–2):117–20.

181. Khazaei MR, Bakhti M, Habibi-Rezaei M. Nicotine reduces the cytotoxic effect of glycated proteins on microglial cells. *Neurochem Res.* 2010;35(4):548–58.

182. Uspenska K, Lykhmus O, Gergalova G, Chernyshov V, Arias HR, Komisarenko S, et al. Nicotine facilitates nicotinic acetylcholine receptor targeting to mitochondria but makes them less susceptible to selective ligands. *Neurosci Lett.* 2017;656.

183. Itier V, Bertrand D. Neuronal nicotinic receptors: from protein structure to function. *FEBS Lett.* 2001;504:118–25.

184. Lodisch H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. In: *Molecular Cell Biology* [Internet]. 2000. p. Section 12.3, The Role of Topoisomerases in DNA Re. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21703/>

185. Ke L, Eisenhour CM, Bencherif M, Lukas RJ. Effects of chronic nicotine treatment on expression of diverse nicotinic acetylcholine receptor subtypes. I. Dose- and time-dependent effects of nicotine treatment. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 1998;286(2):825–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9694939>

186. Arias HR. Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. In: *Pharmacology of Nicotinic Receptors from the Basic and Therapeutic Perspectives* [Internet]. 2011. p. 151–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23712602>

187. Kim JS, Padnya A, Weltzin M, Edmonds BW, Schulte MK, Glennon RA. Synthesis of desformylflustrabromine and its evaluation as an $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 7$ nACh receptor modulator. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2007;17(17):4855–60.

188. Nemezc Á, Taylor P. Creating an $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine recognition domain from the acetylcholine-binding protein: Crystallographic and ligand selectivity analyses. *J Biol Chem.* 2011;286(49):42555–65.

189. Chen D, Dang H, Patrick JW. Contributions of N-linked glycosylation to the expression of a functional $\alpha 7$ -nicotinic receptor in *Xenopus* oocytes. *J*

- Neurochem [Internet]. 1998;70(1):349–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9422381>
190. Cormier a, Morin C, Zini R, Tillement JP, Lagrue G. In vitro effects of nicotine on mitochondrial respiration and superoxide anion generation. *Brain Res* [Internet]. 2001;900(1):72–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11325348>
191. Xie YX, Bezard E, Zhao BL. Investigating the receptor-independent neuroprotective mechanisms of nicotine in mitochondria. *J Biol Chem*. 2005;280(37):32405–12.
192. Uspenska K, Lykhmus O, Arias HR, Pons S, Maskos U, Komisarenko S, et al. Positive allosteric modulators of $\alpha 7^*$ or $\beta 2^*$ nicotinic acetylcholine receptors trigger different kinase pathways in mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol*. 2018;99:226–35.
193. Andersen ND, Nielsen BE, Corradi J, Tolosa MF, Feuerbach D, Arias HR, et al. Exploring the positive allosteric modulation of human $\alpha 7$ nicotinic receptors from a single-channel perspective. *Neuropharmacology*. 2016;107:189–200.
194. Arias HR, Ravazzini F, Targowska-Duda KM, Kaczor AA, Feuerbach D, Boffi JC, et al. Positive allosteric modulators of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors affect neither the function of other ligand- and voltage-gated ion channels and acetylcholinesterase, nor β -amyloid content. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016;76:19–30.
195. Wonnacott S, Barik J. Tocris Bioscience Scientific Review Series Nicotinic ACh Receptors. [cited 2018 Mar 9]; Available from: http://www.komabiotech.co.kr/pdf/nicotinic_ach_receptors_review.pdf
196. Bodnar AL, Cortes-Burgos L a, Cook KK, Dinh DM, Groppi VE, Hajos M, et al. Discovery and structure-activity relationship of quinuclidine benzamides as agonists of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Med Chem*. 2005;48(4):905–8.
197. Arias HR. Molecular Interactions between Ligands and Nicotinic Acetylcholine Receptors Revealed by Studies with Acetylcholine Binding Proteins. *J Thermodyn Cat* [Internet]. 2012;3(4):116. Available from: <https://www.omicsonline.org/molecular-interactions-between-ligands-and-nicotinic-acetylcholine-receptors-revealed-by-studies-with-acetylcholine-binding-proteins->

2157-7544.1000116.php?aid=9620

198. Hurst RS, Hajós M, Raggenbass M, Wall TM, Higdon NR, Lawson J a, et al. A novel positive allosteric modulator of the $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor: in vitro and in vivo characterization. *J Neurosci*. 2005;25(17):4396–405.

199. Targowska-Duda KM, Jozwiak K, Kaczor AA, Arias HR. Molecular interactions of type I and type II positive allosteric modulators with the human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor: an in silico study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2018.

200. daCosta CJB, Sine SM. Stoichiometry for drug potentiation of a pentameric ion channel. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2013;110(16):6595–600. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1301909110>

201. Gill JK, Savolainen M, Young GT, Zwart R, Sher E, Millar NS. Agonist activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors via an allosteric transmembrane site. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2011;108(14):5867–72. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1017975108>

202. Bertrand D, Bertrand S, Cassar S, Gubbins E, Li J, Gopalakrishnan M. Positive Allosteric Modulation of the $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor: Ligand Interactions with Distinct Binding Sites and Evidence for a Prominent Role of the M2-M3 Segment. *Mol Pharmacol*. 2008;74(5):1407–16.

203. Kuang G, Wang X, Halldin C, Nordberg A, Långström B, Ågren H, et al. Theoretical study of the binding profile of an allosteric modulator NS-1738 with a chimera structure of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Phys Chem Chem Phys*. 2016;18(40):28003–9.

204. Pandya AG, Hynan LS, Bhore R, Riley FC, Guevara IL, Grimes P, et al. Reliability assessment and validation of the Melasma Area and Severity Index (MASI) and a new modified MASI scoring method. *J Am Acad Dermatol*. 2011;64(1).

205. Weltzin MM, Schulte MK. Desformylflustrabromine Modulates $\alpha 4\beta 2$ Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor High- and Low-Sensitivity Isoforms at Allosteric Clefts Containing the $\beta 2$ Subunit. *J Pharmacol Exp Ther [Internet]*.

2015;354(2):184–94.

206. Deba F, Ali HI, Tairu A, Ramos K, Ali J, Hamouda AK. LY2087101 and dFBr share transmembrane binding sites in the $(\alpha 4)\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Sci Rep*. 2018;8(1).

207. Arias HR, Gu RX, Feuerbach D, Wei DQ. Different interaction between the agonist JN403 and the competitive antagonist methyllycaconitine with the human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry*. 2010;49(19):4169–80.

208. Arias HR, Lykhmus O, Uspenska K, Skok M. Coronaridine congeners modulate mitochondrial $\alpha 3\beta 4^*$ nicotinic acetylcholine receptors with different potency and through distinct intra-mitochondrial pathways. *Neurochem Int*. 2018;114.

209. Glick SD, Sell EM, McCallum SE, Maisonneuve IM. Brain regions mediating $\alpha 3\beta 4$ nicotinic antagonist effects of 18-MC on nicotine self-administration. *Eur J Pharmacol*. 2011;669(1–3):71–5.

210. Pace CJ, Glick SD, Maisonneuve IM, He LW, Jokiel PA, Kuehne ME, et al. Novel iboga alkaloid congeners block nicotinic receptors and reduce drug self-administration. *Eur J Pharmacol*. 2004;492(2–3):159–67.

211. Arias HR, Jin X, Feuerbach D, Drenan RM. Selectivity of coronaridine congeners at nicotinic acetylcholine receptors and inhibitory activity on mouse medial habenula. *Int J Biochem Cell Biol*. 2017;92:202–9.

212. Yu WF, Guan ZZ, Nordberg A. Postnatal upregulation of $\alpha 4$ and $\alpha 3$ nicotinic receptor subunits in the brain of $\alpha 7$ nicotinic receptor-deficient mice. *Neuroscience*. 2007;146(4):1618–28.

213. Schaal C, Chellappan S. Nicotine-mediated regulation of nicotinic acetylcholine receptors in non-small cell lung adenocarcinoma by E2F1 and STAT1 transcription factors. *PLoS One*. 2016;11(5).

214. Maisonneuve IM, Glick SD. Anti-addictive actions of an iboga alkaloid congener: A novel mechanism for a novel treatment. *Pharmacol Biochem Behav*. 2003;75(3):607–18.

215. Arias HR, Targowska-Duda KM, Feuerbach D, Jozwiak K. Coronaridine

congeners inhibit human $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors by interacting with luminal and non-luminal sites. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015;65:81–90.

216. Uspenska K, Lykhmus O, Obolenskaya M, Pons S, Maskos U, Komisarenko S, et al. Mitochondrial Nicotinic Acetylcholine Receptors Support Liver Cells Viability After Partial Hepatectomy. *Front Pharmacol.* 2018;9:626.

217. Xu W, Orr-Urtreger A, Nigro F, Gelber S, Sutcliffe CB, Armstrong D, et al. Multiorgan autonomic dysfunction in mice lacking the $\beta 2$ and the $\beta 4$ subunits of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci.* 1999;19(21):9298–305.

218. Plazas P V, Katz E, Gomez-Casati ME, Bouzat C, Elgoyhen AB. Stoichiometry of the $\alpha 9\alpha 10$ Nicotinic Cholinergic Receptor. *J Neurosci* [Internet]. 2005;25(47):10905–12. Available from:

<http://www.jneurosci.org/content/25/47/10905.abstract>

219. McIntosh JM, Plazas P V, Watkins M, Gomez-Casati ME, Olivera BM, Elgoyhen a B. A novel alpha-conotoxin, PeIA, cloned from *Conus pergrandis*, discriminates between rat $\alpha 9\alpha 10$ and $\alpha 7$ nicotinic cholinergic receptors. *J Biol Chem* [Internet]. 2005;280(34):30107–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15983035>

220. Lykhmus O, Voytenko LP, Lips KS, Bergen I, Krasteva-Christ G, Vetter DE, et al. Nicotinic Acetylcholine Receptor $\alpha 9$ and $\alpha 10$ Subunits Are Expressed in the Brain of Mice. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2017;11. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2017.00282/full>

221. Skok VI. Nicotinic acetylcholine receptors in autonomic ganglia. Vol. 97, *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical.* 2002. p. 1–11.

222. Del Signore A, Gotti C, Rizzo A, Moretti M, Paggi P. Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtypes in the Rat Sympathetic Ganglion: Pharmacological Characterization, Subcellular Distribution and Effect of Pre- and Postganglionic Nerve Crush. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004;63(2):138–50.

223. Grady SR, Moretti M, Zoli M, Marks MJ, Zanardi A, Pucci L, et al. Rodent Habenulo-Interpeduncular Pathway Expresses a Large Variety of Uncommon nAChR Subtypes, But Only the $\alpha 3\beta 4^*$ and $\alpha 3\beta 3\beta 4^*$ Subtypes Mediate Acetylcholine

- Release. *J Neurosci* [Internet]. 2009;29(7):2272–82. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.5121-08.2009>
224. Papke RL, Heinemann SF. The role of the $\beta 4$ -subunit in determining the kinetic properties of rat neuronal nicotinic acetylcholine $\alpha 3$ -receptors. *J Physiol* [Internet]. 1991;440:95–112. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1180142&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
225. Houlihan LM, Slater Y, Guerra DL, Peng JH, Kuo YP, Lukas RJ, et al. Activity of cytisine and its brominated isosteres on recombinant human $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 4\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem*. 2001;78(5):1029–43.
226. Ortells MO, Lunt GG. Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci*. 1995;18(3):121–7.
227. Elgoyhen AB, Johnson DS, Boulter J, Vetter DE, Heinemann S. $\alpha 9$: An acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell*. 1994;79(4):705–15.
228. Colomer C, Olivos-Oré LA, Vincent A, McIntosh JM, Artalejo AR, Guérineau NC. Functional characterization of $\alpha 9$ -containing cholinergic nicotinic receptors in the rat adrenal medulla: implication in stress-induced functional plasticity. *J Neurosci* [Internet]. 2010;30(19):6732–42. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2994257&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
229. Michalopoulos GK. Liver Regeneration after Partial Hepatectomy. *Am J Pathol* [Internet]. 2010;176(1):2–13. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010603173>
230. Peng H, Ferris RL, Matthews T, Hiel H, Lopez-Albaitero A, Lustig LR. Characterization of the human nicotinic acetylcholine receptor subunit $\alpha 9$ (CHRNA9) and $\alpha 10$ (CHRNA10) in lymphocytes. *Life Sci*. 2004;76(3):263–80.
231. Hao J, Simard AR, Turner GH, Wu J, Whiteaker P, Lukas RJ, et al. Attenuation of CNS inflammatory responses by nicotine involves $\alpha 7$ and non- $\alpha 7$

nicotinic receptors. *Exp Neurol*. 2011;227(1):110–9.

232. Qian J, Galitovskiy V, Chernyavsky AI, Marchenko S, Grando SA. Plasticity of the murine spleen T-cell cholinergic receptors and their role in in vitro differentiation of nave CD4 T cells toward the Th1, Th2 and Th17 lineages. *Genes Immun*. 2011;12(3):222–30.

233. Vincler M, McIntosh JM. Targeting the alpha(9)alpha(10) nicotinic acetylcholine receptor to treat severe pain. *Expert Opin Ther Targets*. 2007;11(7):891–7.

234. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* [Internet]. 2000;32:19–31. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827800804122>

235. Obolenskaya M, Schulze-Specking A, Plaumann B, Frenzer K, Freudenberg N, Decker K. Nitric oxide production by cells isolated from regenerating rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;204(3):1305–11.

236. Iimuro Y, Fujimoto J. TLRs, NF-κB, JNK, and liver regeneration. *Gastroenterology Research and Practice*. 2010.

237. Kountouras J, Boura P, Lygidakis NJ. Liver regeneration after hepatectomy. Vol. 48, *Hepato-Gastroenterology*. 2001. p. 556–62.

238. Tarlá MR, Ramalho FS, Ramalho LNZ, Castro E Silva T, Brandão DF, Ferreira J, et al. A molecular view of liver regeneration. *Acta Cir Bras*. 2006;21(SUPPL.1).

239. Markiewski MM, DeAngelis RA, Lambris JD. Liver inflammation and regeneration: Two distinct biological phenomena or parallel pathophysiologic processes? Vol. 43, *Molecular Immunology*. 2006. p. 45–56.

240. Wee Yong V. Inflammation in neurological disorders: A help or a hindrance? Vol. 16, *Neuroscientist*. 2010. p. 408–20.

241. Chung YC, Ko HW, Bok E, Huh SH, Nam JH, Jin BK. The role of neuroinflammation on the pathogenesis of Parkinson ' s disease. *BMB Rep*. 2010;43(4):225–32.

242. Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. Immune attack: The role of inflammation in Alzheimer disease. Vol. 16, *Nature Reviews Neuroscience*. 2015. p.

358–72.

243. Terrando N, Yang T, Ryu JK, Newton PT, Monaco C, Feldmann M, et al. Stimulation of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor protects against neuroinflammation after tibia fracture and endotoxemia in mice. *Mol Med* [Internet]. 2015;20(5):667–75.

244. Lykhmus O, Mishra N, Koval L, Kalashnyk O, Gergalova G, Uspenska K, et al. Molecular Mechanisms Regulating LPS-Induced Inflammation in the Brain. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 2016;9(March):1–13. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnmol.2016.00019/abstract>

245. Lykhmus O, Voytenko L, Koval L, Mykhalskiy S, Kholin V, Peschana K, et al. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor-specific antibody induces inflammation and amyloid $\beta 42$ accumulation in the mouse brain to impair memory. *PLoS One*. 2015;10(3).

246. Lykhmus O, Uspenska K, Koval L, Lytovchenko D, Voytenko L, Horid'ko T, et al. N-Stearoylethanolamine protects the brain and improves memory of mice treated with lipopolysaccharide or immunized with the extracellular domain of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Int Immunopharmacol*. 2017;52.

247. Hansen HS, Moesgaard B, Hansen HH, Schousboe A, Petersen G. Formation of N-acyl-phosphatidylethanolamine and N-acylethanolamine (including anandamide) during glutamate-induced neurotoxicity. *Lipids*. 1999;34(6 SUPPL.):S327–30.

248. Schmid HHO, Berdyshev E V. Cannabinoid receptor-inactive N-acylethanolamines and other fatty acid amides: Metabolism and function. Vol. 66, *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2002. p. 363–76.

249. Devane WA, Hanuš L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* (80-). 1992;258(5090):1946–9.

250. Movahed P, Jönsson BAG, Birnir B, Wingstrand JA, Jørgensen TD, Ermund A, et al. Endogenous unsaturated C18 N-acylethanolamines are vanilloid receptor (TRPV1) agonists. *J Biol Chem*. 2005;280(46):38496–504.

251. O'Sullivan SE. Cannabinoids go nuclear: Evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. Vol. 152, British Journal of Pharmacology. 2007. p. 576–82.
252. Oz M. Receptor-independent effects of endocannabinoids on ion channels. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2006;12(2):227–39.
253. T.M. Horid'ko, O.F. Mehed, H.V. Kosiakova, A.H. Berdyshev, V.O. Kholin, .O. Peschana et al. The effect of N-stearoylethanolamine on the antioxidant enzymes, content of nitric oxide and the activity of acetylcholinesterase in the blood plasma and different parts of the brain of female rats under the scopolamine action. *Ukr Biokhim Zh.* 2014;86(2):10–1.
254. Stringfellow DA, Glasgow LA. Tilorone hydrochloride: an oral interferon-inducing agent. *Antimicrob Agents Chemother.* 1972;2(2):73–8.
255. Wang CC, Chio CC, Chang CH, Kuo JR, Chang CP. Beneficial effect of agmatine on brain apoptosis, astrogliosis, and edema after rat transient cerebral ischemia. *BMC Pharmacol.* 2010;10(1).
256. Briggs CA, Schrimpf MR, Anderson DJ, Gubbins EJ, Grønlien JH, Håkerud M, et al. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonist properties of tilorone and related tricyclic analogues. *Br J Pharmacol.* 2008;153(5):1054–61.
257. Schrimpf MR, Sippy KB, Briggs CA, Anderson DJ, Li T, Ji J, et al. SAR of $\alpha 7$ nicotinic receptor agonists derived from tilorone: Exploration of a novel nicotinic pharmacophore. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2012;22(4):1633–8.
258. Loring RH. Agmatine acts as an antagonist of neuronal nicotinic receptors. *Br J Pharmacol.* 1990;99(1):207–11.
259. Uspenska KR, Gergalova GL, Skok M V. The effect of amixin and agmatine on cytochrome c release from isolated mitochondria. *Ukr Biochem J.* 2016;88:5–10.
260. Grancara S, Battaglia V, Martinis P, Viceconte N, Agostinelli E, Toninello A, et al. Mitochondrial oxidative stress induced by Ca^{2+} and monoamines: different behaviour of liver and brain mitochondria in undergoing permeability transition. *Amino Acids* [Internet]. 2012;42(2–3):751–9.
261. Battaglia V, Grancara S, Satriano J, Saccoccio S, Agostinelli E, Toninello A.

Agmatine prevents the Ca²⁺-dependent induction of permeability transition in rat brain mitochondria. In: *Amino Acids*. 2010. p. 431–7.

262. Arndt MA, Battaglia V, Parisi E, Lortie MJ, Isome M, Baskerville C, et al. The arginine metabolite agmatine protects mitochondrial function and confers resistance to cellular apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2009;296(6):C1411-9.

263. Battaglia V, Grancara S, Mancon M, Cravanzola C, Colombatto S, Grillo MA, et al. Agmatine transport in brain mitochondria: A different mechanism from that in liver mitochondria. In: *Amino Acids*. 2010. p. 423–30.

264. Kim K, Damoiseaux R, Norris AJ, Rivina L, Bradley K, Jung ME, et al. High throughput screening of small molecule libraries for modifiers of radiation responses. *Int J Radiat Biol*. 2011;87(8):839–45.

265. Zholobak NM, Kavok NS, Bogorad-Kobelska OS, Borovoy IA, Malyukina MY, Spivak MY. Effect of tilorone and its analogues on the change of mitochondrial potential of rat hepatocytes. *Fiziol Zh* [Internet]. 2012;58(2):39–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22873051>

266. Wissing MD, Dadon T, Kim E, Piontek KB, Shim JS, Kaelber NS, et al. Small-molecule screening of PC3 prostate cancer cells identifies tilorone dihydrochloride to selectively inhibit cell growth based on cyclin-dependent kinase 5 expression. *Oncol Rep*. 2014;32(1):419–24.

267. Wang J, Su R, Wu N, Xu B, Lu X, Liu Y, et al. Inhibitory effect of agmatine on proliferation of tumor cells by modulation of polyamine metabolism. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. 2005;26(5):616–22. 3

268. Glunde K, Bhujwala ZM, Ronen SM. Choline metabolism in malignant transformation. Vol. 11, *Nature Reviews Cancer*. 2011. p. 835–48.

269. Wacker A. , Lodemann E. G V. Distribution of 14 C-tilorone in mice. *Naturwissenschaften* –. 1972;59(11):520–520.

270. Ratan RR, Siddiq A, Aminova L, Langley B, McConoughey S, Karpisheva K, et al. Small molecule activation of adaptive gene expression: Tilorone or its analogs are novel potent activators of hypoxia inducible factor-1 that provide prophylaxis against stroke and spinal cord injury. In: *Annals of the New York Academy of*

Sciences. 2008. p. 383–94.

271. Satriano J, Isome M, Casero R a, Thomson SC, Blantz RC. Polyamine transport system mediates agmatine transport in mammalian cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;281:C329–34.

Додаток 1

Список публікацій за темою дисертаційної роботи

1. **Uspenska K**, Lykhmus O, Obolenska M, Pons S, Maskos U, Komisarenko S, Skok M. Mitochondrial nicotinic acetylcholine receptors support liver cells viability after partial hepatectomy. *Frontiers in Pharmacology*, 2018; 9, article 626:1-12.
2. **Uspenska K**, Lykhmus O, Arias HR, Pons S, Maskos U, Komisarenko S, Skok M. Positive allosteric modulators of $\alpha 7^*$ or $\beta 2^*$ nicotinic acetylcholine receptors trigger different kinase pathways in mitochondria. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2018; 9: 226–235.
3. Arias HR, Lykhmus O, **Uspenska K**, Skok M. Coronaridine congeners modulate mitochondrial $\alpha 3\beta 4^*$ nicotinic acetylcholine receptors with different potency and through distinct intra-mitochondrial pathways. *Neurochemistry International*, 2018;114: 26-32.
4. **Uspenska K**, Lykhmus O, Gergalova G, Chernyshov V, Arias HR, Komisarenko S, Skok M. Nicotine facilitates nicotinic acetylcholine receptor targeting to mitochondria but makes them less susceptible to selective ligands. *Neurosci Lett.*, 2017;656:43-50.
5. Lykhmus O, **Uspenska K**, Koval L, Lytovchenko D, Voytenko L, Horid'ko T, Kosiakova H, Gula N, Komisarenko S, Skok M. N-stearoylethanolamine protects the brain and improves memory of mice treated with lipopolysaccharide or immunized with the extracellular domain of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Int Immunopharmacol*, 2017; 52:290-296.
6. Skok M, Gergalova G, Lykhmus O, Kalashnyk O, Koval L, **Uspenska K**. Nicotinic acetylcholine receptors in mitochondria : subunit composition, function and signaling. *Neurotransmitter*, 201; 3: e1290.
7. Lykhmus O, Mishra N, Koval L, Kalashnyk O, Gergalova G, **Uspenska K**, Komisarenko S, Soreq H, Skok M. Molecular Mechanisms Regulating LPS-Induced Inflammation in the Brain. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2016; 9(19): 1-13.

8. **Uspenska KR**, Gergalova GL, Lykhmus OYu, Skok MV. The effect of amixin and agmatine on cytochrome c release from isolated mitochondria. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 2016; 88 (1): 5-10.

Відомості про апробацію результатів дисертації

1. **Середницька К.Р.**, Гергалова Г.Л., Лихмус О.Ю., Скок М.В. Препарати Аміксин та агматин впливають на функціонування нікотинового ацетилхолінового рецептора мітохондрій. *Матеріали XI з'їзду Українського біохімічного товариства*; 2014 Жов 6-10; Україна, Київ; *Ukr.Biochem.J.*, 2014; 86(5,Suppl.2), с. 137 (форма участі – постерна доповідь);
2. **Успенська К.Р.**, Лихмус О.Ю. Субодиничний склад та функціонування нікотинових ацетилхолінових рецепторів у мітохондріях мишей нокаутних за генами $\alpha 3$, $\alpha 7$, $\beta 2$ або $\beta 4$ субодиниць. *Матеріали конф.-конкурсу молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016»*; 2016 Трав 26-27; Україна, Київ; 2016. с. 53 (форма участі – усна доповідь).
3. Skok M, Lykhmus O, Koval L, **Uspenska K**. The key role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in neuroinflammation and memory impairment. *Матеріали міжнр. симп. «XVth International Symposium on Cholinergic Mechanisms»*; 2016 Жов 16-20; Франція, Марсель, 2016. с. 35 (форма участі – заочна).
4. **Uspenska K**, Lykhmus O, Arias HR, Maskos U, Skok MV. Nicotinic acetylcholine receptors in mitochondria: structure, origin, mode of functioning. *Матеріали міжнр. конгресу «41st FEBS Congress»*. Турція, Кушідасі. *The FEBS Journal*, 2016; 283(Suppl. 1), 2016. с. 434 (форма участі – заочна).
5. **Uspenska K**, Lykhmus O, Skok M. Functioning and physiological role of nicotinic acetylcholine receptors in mitochondria. *Матеріали міжнр. конф. «Conference of Young Scientists»*; 2017 Чер 6-9; Україна, Київ. *Ukr.Biochem.J.* 2017, 89(3), с.111 (форма участі – усна доповідь).
6. **Uspenska K**, Lykhmus O, Skok M. Nicotine facilitates nicotinic acetylcholine receptor targeting to mitochondria but makes them less susceptible to specific

ligands. Матеріали міжнр. конгресу «*42nd FEBS Congress*»; 2017 Вер 10-14; Ізраїль, Єрусалим; *The FEBS Journal*, 2017, 284 (Suppl. 1), с. 151 (форма участі – постерна доповідь).

7. **Uspenska K**, Lykhmus O, Obolenska M, Maskos U, Skok M. Mitochondrial nicotinic acetylcholine receptors: physiological value and mechanism of functioning. Матеріали міжнр.конф. “*Nicotinic Acetylcholine Receptors 2017*”; 2017 Тра 7-11; Греція, Крит; 2017, с. S47. (форма участі – заочна)

8. **Uspenska KR**. Biological role of nicotinic acetylcholine receptors in mitochondria. Матеріали міжнр. конф. мол. уч. «*FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference*»; 2018 Вер 3-5; Україна, Київ. – *Ukr. Biochem. J.*, 2018, 90(3), с. 106(форма участі – усна доповідь).

9. **Uspenska K**, Lykhmus O, Skok MV. Role of Mitochondrial Nicotinic Acetylcholine Receptors in Knock-Out Mice and after Partial Hepatectomy in Rats. Матеріали міжнр. симп. мол. уч. “*15th Horizons in molecular biology*”; 2018 Вер 10-13; Німеччина, Геттінген; 2018, с. 175 (форма участі – постерна доповідь).