

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова Российской академии наук

Шелухина Ирина Валерьевна

Никотиновые и родственные рецепторы
нейромедиаторов: механизмы функциональной
активности и новые лиганды

Специальность 02.00.10 Биоорганическая химия
Диссертационная работа на соискание ученой степени
доктора химических наук

Научный консультант:

Чл.-корр. РАН д.х.н. Цетлин Виктор Ионович

Москва – 2019

СОДЕРЖАНИЕ

1	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
2	ВВЕДЕНИЕ.....	8
3	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ.....	11
3.1	Никотиновые и родственные рецепторы нейромедиаторов. Семейство Cys-петельных рецепторов.....	11
3.2	Строение Cys-петельных рецепторов.....	14
3.2.1	Внеклеточный домен.....	16
3.2.2	Трансмембранный домен.....	16
3.2.3	Химерные белки.....	17
3.2.4	Внутриклеточный домен.....	17
3.2.5	Лиганд-связывающие участки.....	19
3.2.5.1	Ортостерический лиганд-связывающий участок.....	19
3.2.5.2	Канальные связывающие центры.....	21
3.2.5.3	Аллостерические участки связывания лигандов.....	22
3.3	Функционирование nAХР.....	24
3.4	Мышечный nAХР.....	29
3.4.1	Связь мышечного nAХР с заболеваниями.....	30
3.4.1.1	Миастения гравис.....	30
3.4.1.2	Врожденные миастенические синдромы.....	31
3.5	Нейрональные nAХР.....	32
3.5.1	Связь нейрональных nAХР с заболеваниями.....	36
3.5.1.1	Нейродегенеративные заболевания.....	36
3.5.1.1.1	Болезнь Альцгеймера.....	37
3.5.1.2	Шизофрения.....	40
3.5.1.3	Аутизм.....	41
3.5.1.4	Хроническая боль.....	42
3.6	nAХР «не-нейронального» происхождения.....	45
3.6.1	Холинергический противовоспалительный рефлекс.....	46
3.6.1.1	Роль $\alpha 7$ nAХР моноцитов/макрофагов.....	47
3.6.1.2	Роль $\alpha 7$ nAХР микроглии и астроцитов.....	47
3.6.1.3	Сигнальные каскады, запускаемые активацией $\alpha 7$ nAХР.....	48
3.7	Лиганды nAХР.....	48
3.7.1	Агонисты nAХР.....	50
3.7.1.1	Полные агонисты nAХР.....	50

3.7.1.2	Частичные агонисты nAHP	55
3.7.2	Антагонисты nAHP	57
3.7.2.1	Конкурентные антагонисты nAHP	57
3.7.2.1.1	α -Нейротоксины змей	57
3.7.2.1.2	α -Конотоксины	59
3.7.2.1.3	Низкомолекулярные конкурентные антагонисты nAHP	60
3.7.2.2	Неконкурентные антагонисты nAHP	62
3.7.3	Позитивные аллостерические модуляторы (ПАМ) nAHP	63
4	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	68
4.1	Материалы	68
4.2	Методы	70
4.2.1	Работа с животными	70
4.2.2	Молекулярно-биологические методы	78
4.2.3	Клеточные работы	82
4.2.4	Цито- и гистохимия	91
4.2.5	Кальциевый имиджинг	98
4.2.6	Электрофизиология	101
4.2.7	Радиолигандный анализ	105
4.2.8	<i>In silico</i> методы	106
5	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	108
5.1	Разработка методов цито- и гистохимической детекции и анализа аффинности и специфичности к лигандам Cys-петельных рецепторов с использованием природных пептидно-белковых нейротоксинов, а также их флуоресцентных и биотинилированных аналогов	108
5.2	Различия в специфичности, аффинности и механизме связывания трехпетельных α -нейротоксинов с разными Cys-петельными рецепторами и их моделями	112
5.3	Определение селективности, аффинности и механизма ингибирования nAHP синтетическим трехпетельным белком SLURP-1 человека. Подход кальциевого имиджинга	117
5.4	Функциональная активность nAHP в организме. Ноцицепция	127
5.4.1	Подтипы ацетилхолиновых рецепторов в мозговых оболочках	131
5.4.2	Эндогенная холинергическая система мозговых оболочек	132
5.4.3	Клеточные мишени действия эндогенного АХ. Сенсорные нейроны тройничного ганглия	134
5.4.4	Клеточные мишени действия эндогенного АХ. Сенсорные нейроны спинномозгового ганглия	137

5.4.5	Нейрохимический профиль сенсорных нейронов, экспрессирующих $\alpha 7$ nAХР	140
5.4.6	Аксональная локализация и транспорт $\alpha 7$ nAХР в сенсорных нейронах	141
5.4.7	Выброс CGRP сенсорными нейронами	143
5.4.8	Клеточные мишени действия эндогенного АХ. Тучные клетки	145
5.4.9	Роль холинергической нервной передачи при ноцицепции в оболочках головного мозга	147
5.5	Функциональная активность nAХР в организме. Воспаление	149
5.6	Нейропластичность. Норма и патология	154
5.6.1	Нейрогенез	154
5.6.2	Ранние стадии болезни Паркинсона	161
5.7	Низкомолекулярные соединения	167
5.7.1	6-бромогипафорин	168
5.7.2	Производные хинолина	170
5.7.3	Алкалоиды из яда кураре племени Matis	173
5.8	Доклинические исследования эффективности и безопасности лекарственного средства на основе синтетического пептида аземиопсина в качестве миорелаксанта	179
5.8.1	Специфическая активность Az <i>in vitro</i>	180
5.8.2	Специфическая миорелаксанта активность Az	182
5.8.3	Фармакокинетика Az	184
5.8.4	Острая токсичность Az	186
5.8.5	Субхроническая токсичность Az	187
5.8.6	Иммунотоксичность Az	188
5.8.7	Аллергенность Az	191
5.8.8	Мутагенность Az	192
5.8.9	Доклинический профиль Az	193
6	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	195
7	ВЫВОДЫ	203
8	БЛАГОДАРНОСТИ	205
9	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	208

1 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- Alexa Fluor 488- α Bgt – Alexa Fluor 488-меченый α -бунгаротоксин (*Bungarus multicinctus*)
- Alexa Fluor 555- α Bgt – Alexa Fluor 555-меченый α -бунгаротоксин (*Bungarus multicinctus*)
- Alexa Fluor 546-CTX – Alexa Fluor 546-меченый α -кобротоксин (*Naja kaouthia*)
- A β – бета-амилоидный пептид
- AChE – ацетилхолинэстераза
- APP – amyloid precursor protein, предшественник бета-амилоидного пептида
- AUC – площадь под фармакокинетической кривой
- Az – лекарственное средство на основе синтетического пептида аземиопсина (DNWWPKRRHQGPRPPRPRPKP)
- BuChE – бутирилхолинэстераза
- BBIQA – bisbenzyltetrahydroisoquinoline alkaloid
- α Bgt – α -бунгаротоксин (*Bungarus multicinctus*)
- Case12 – флуоресцентный одноволновой белковый кальциевый сенсор
- [Ca²⁺]_ц – цитоплазматическая концентрация ионов Ca²⁺
- CGRP – calcitonin gene-related peptide – пептид, экспрессирующийся при альтернативном сплайсинге гена кальцитонина
- Cmax – максимальная концентрация вещества в крови
- CTX – α -кобротоксин (*Naja kaouthia*)
- DAPI – 4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид
- DCX – даблкортин
- d*-TC – *d*-тубокурарин
- EAMG – экспериментально-индуцированная аутоиммунная миастения
- EC₅₀ – полумаксимальная эффективная концентрация
- ELIC – прокариотический лиганд-связывающий ионный канал *Erwinia chrysanthemi*
- ECL – extracellular loop, внеклеточная петля
- fMLF – N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine, хемотактический трипептид бактериального происхождения
- FITC – флуоресцеинизотиоцианат
- FITC-CTX – FITC-меченый α -кобротоксин (*Naja kaouthia*)
- коммерчески доступного низкомолекулярного кальциевого индикатора Fluo-4
- GFAP – glial fibrillary acidic protein – глиальный фибриллярный кислый белок

GFP – зеленый флуоресцентный белок
 GluCl – глутамат-управляемый хлорный канал *Caenorhabditis elegans*
 GLIC – прокариотический лиганд-связывающий ионный канал *Gloeobacter violaceus*
 HAP – high-affinity peptide, высокоаффинный пептид (WRYYESSLLPYPD)
 5-HT_{3A}P – лиганд-управляемый серотониновый рецептор
 IB4 – изолектин B4
 IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования
¹²⁵I- α Bgt – йодированный α -бунгаротоксин (*Bungarus multicinctus*)
 MBP – myelin basic protein – основной белок миелина
 MuSK – мышечная киназа
 MIR – main immunogenic region – главный иммуногенный регион
 NGF – фактор роста нервов
 NF200 – высокомолекулярный белок (200 кДа) нейрофиламентов
 NF-H – тяжелый компонент нейрофиламентов
 NF-L – легкий компонент нейрофиламентов
 NTI – α -нейротоксин I (*Naja oxiana*)
 NTII – α -нейротоксин II (*Naja oxiana*)
 PGP 9.5 – protein gene product 9.5 – цитоплазматический белок нейронов
 PI – йодид пропидия
 PVDF – поливинилидендифторид
 SLURP-1 – secreted Lyb/urokinase-type plasminogen receptor-related protein
 T1/2 – период полувыведения вещества из крови
 TMRE – tetramethylrhodamine ethyl ester, этиловый эфир тетраметилродамина
 TRPV1 – капсаицин-чувствительный ванилоидный рецептор VR1, относящийся к семейству неселективных ионных каналов TRP
 α 7^{-/-} мыши – мыши, гомозиготные по нокаутному варианту гена α 7-субъединицы nAChR
 α 7^{+/+} мыши – мыши, гомозиготные по нативному варианту гена α 7-субъединицы nAChR
 АФК – активные формы кислорода
 АХ – ацетилхолин
 АХСБ – ацетилхолинсвязывающий белок
 биот-СТХ – биотинилированный СТХ
 БСА – бычий сывороточный альбумин
 6-БГФ – 6-бромогипафорин
 БП – болезнь Паркинсона

в/в – внутривенно

в/м – внутримышечно

ГАМК_A-рецептор – рецептор γ -аминомасляной кислоты

ГГФТ – гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза

ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа

ЗФ – зубчатая фасция

ЛД₅₀ – средняя доза вещества, вызывающая гибель половины животных испытываемой группы

мАТ – моноклональные антитела

нАХР – никотиновый ацетилхолиновый рецептор

НАФ – неполный адъювант Фрейнда

ПААГ – полиакриламидный гель

пАТ – поликлональные антитела

ПД – потенциал действия

ПНС – периферическая нервная система

ПАМ – позитивный аллостерический модулятор

ПАФ – полный адъювант Фрейнда

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ТНБС – тринитробензолсульфоновая кислота

ТСУ – токсин-связывающий участок

ФНО – фактор некроза опухолей

ЦНС – центральная нервная система

2 ВВЕДЕНИЕ

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нАХР) относят к пентамерным лиганд-управляемым ионным каналам, семейству Cys-петельных рецепторов. Другими представителями этого семейства у человека являются рецепторы таких нейромедиаторов, как γ -аминомасляная кислота, глицин и серотонин (подтип 5-НТЗ). Все эти рецепторы объединяет весьма консервативное пространственное строение, а также единый механизм функционального ответа на воздействие нейромедиатора: связывание лиганда во внеклеточном домене рецептора запускает каскад конформационных перестроек, приводящих к открытию трансмембранного канала, переносу ионов и изменению мембранного потенциала. Cys-петельные рецепторы отличает богатое разнообразие подтипов благодаря комбинации набора субъединиц и широкое распространение в организме человека, где они найдены не только во всех отделах нервной системы, но и за ее пределами, экспрессируясь самыми разнообразными клетками: нервными, глиальными, иммунными, мышечными, эпителиальными и др.

Нарушение функционирования никотиновых и родственных рецепторов нейромедиаторов связывают с набором неврологических, психических, нейродегенеративных, воспалительных и других патологий (шизофрения, аутизм, эпилепсия, болезни Альцгеймера и Паркинсона, мигрень, миастения, сепсис, ревматоидный артрит и др.). Для большинства данных заболеваний в настоящее время проводится симптоматическое лечение, приводящее к улучшению общего состояния пациента, но не устраняющее причин развития патологии. Хотя при проведении комплексной терапии Cys-петельные рецепторы служат важной фармакологической мишенью, многие аспекты их функциональной активности в организме остаются неизученными. Например, не так давно был открыт холинергический противовоспалительный рефлекс, опосредованный активацией $\alpha 7$ нАХР макрофагов в ответ на холинергическую нервную сигнализацию. Этот пример взаимодействия нервной и иммунной систем уже успел стать классическим и сейчас появляется все больше подтверждений комплексного характера клеточно-тканевого ответа при холинергической иннервации. Таким образом, актуальной проблемой современной биоорганической химии является выяснение механизмов функционирования никотиновых и родственных рецепторов нейромедиаторов на молекулярном, клеточном и организменном уровнях, особенно в таких фактически неисследованных областях их активности как болевая чувствительность (ноцицепция) при мигрени, нейропластичность головного мозга при

нейрогенезе во взрослом организме и на досимптомной стадии болезни Паркинсона, а также регуляция защитных реакций нейтрофилов при развитии острого воспалительного процесса в организме.

Исторически многие открытия базовых молекулярных механизмов активности ионных каналов связаны именно с работами в области Gys-петельных рецепторов. Интерес к этой сфере не угасает и в настоящее время, что подчеркивается циклом недавних исследований впервые полученных кристаллических структур всех основных представителей Gys-петельных рецепторов, которым предшествовали структурные исследования их моделей. Несмотря на проведенные масштабные структурные исследования многие детали узнавания этими рецепторами как низкомолекулярных, так и пептидно-белковых лигандов остаются нераскрытыми. Особенно это актуально в случае многообразных аллостерических модуляторов Gys-петельных рецепторов, для которых зачастую не только не определен участок связывания с рецептором, но даже нет единого мнения насчет их селективности. Вопрос селективности и механизма связывания с рецептором подробно пересматривается и для классических лигандов Gys-петельных рецепторов, что обусловлено появлением более совершенных инструментальных методов характеристики функциональной активности ионных каналов. Широкое распространение получили флуоресцентные методики, усовершенствовалась и ускорилась электрофизиология, также расширился и спектр используемых объектов исследований. Однако применение той или иной методики в области исследований Gys-петельных рецепторов требует очень тщательной проверки ее специфичности, иногда влекущей за собой поиск альтернативных вариантов. Таким образом, актуальными являются цель и задачи представленной диссертационной работы.

Цель настоящей работы состояла в выявлении и характеристике новых аспектов функциональной активности никотиновых и родственных рецепторов нейромедиаторов в процессах нейропластичности, ноцицепции и воспаления, а также деталей орто- и аллостерических молекулярных механизмов узнавания ими пептидно-белковых и низкомолекулярных лигандов. Для достижения данной цели был поставлен и реализован ряд задач:

- 1) разработка уникального комплексного подхода для изучения клеточно-тканевой локализации и функциональных характеристик Gys-петельных рецепторов, сочетающего флуоресцентный и радиолигандный анализ с использованием пептидно-белковых нейротоксинов, а также метод кальциевого имиджинга и электрофизиологию;

- 2) определение селективности, механизма связывания и аффинности различных α -нейротоксинов и родственных трехпетельных белков в отношении ряда Cys-петельных рецепторов и их моделей;
- 3) изучение ноцицептивных механизмов с участием холинергической системы *ex vivo* и *in vitro*;
- 4) исследование механизмов холинергической регуляции активности иммунных клеток на примере нейтрофилов;
- 5) анализ роли нАХР в механизмах нейропластичности взрослого мозга грызунов в физиологическом состоянии и при моделировании патологии;
- 6) поиск новых низкомолекулярных агонистов и антагонистов различных подтипов нАХР и определение специфичности, аффинности, кинетики, механизма и других особенностей их связывания с рецепторами;
- 7) доклинические испытания эффективности и безопасности лекарственного средства на основе синтетического полипептида аземиопсина, компонента яда бирманской гадюки *Azemiops feae*, в качестве миорелаксанта.

3 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ

3.1 Никотиновые и родственные рецепторы нейромедиаторов. Семейство Cys-петельных рецепторов

Новаторская работа Лэнгли 1905 г. [1] открыла существование рецепторов нервных импульсов в поперечно-полосатой мускулатуре, чувствительных к растительному алкалоиду никотину. Более поздние работы Loewi O. [2] и Dale H. [3] показали, что эндогенным нейромедиатором этих рецепторов является вещество, выделяемое блуждающим нервом – ацетилхолин. После открытия ацетилхолина в качестве сигнальной молекулы усилия ученых были направлены на изучение функционирования этих рецепторов в тканях. Fatt P. и Katz B. одними из первых зафиксировали развитие потенциала действия, возникающего в мышечной клетке в ответ на действие ацетилхолина на никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нАХР) [4]. Открытие того, что активация нАХР мышечного типа также лежит в основе способности ската *Torpedo* генерировать сильные электрические разряды, позволило выделить этот белковый комплекс из электрического органа ската [5], а затем клонировать субъединицы мышечного нАХР *Torpedo* и млекопитающих [6, 7]. Пентамерный рецептор *Torpedo* состоит из четырех типов субъединиц: двух $\alpha 1$, одной $\beta 1$, γ и δ , названных так по возрастанию молекулярной массы при их электрофоретическом разделении в ПААГ [8]. На основании нуклеотидных последовательностей субъединиц мышечного нАХР стало возможным клонировать и выделять нейрональные нАХР [9-12]. Вновь обнаруженные субъединицы относили к типу α , если в их составе обнаруживалась пара консервативных вицинальных (соседних) остатков цистеина, дисульфидно-замкнутых в мышечном нАХР *Torpedo* и млекопитающих и важных для функционирования рецептора. Те же субъединицы, которые не имели вицинальных цистеинов и при коэкспрессии в составе мышечного рецептора могли заменять $\beta 1$ -субъединицу, были отнесены к β типу [13, 14]. Таким образом, на данный момент насчитывается девять α ($\alpha 2$ – $\alpha 10$) и три β ($\beta 2$ – $\beta 4$) субъединицы, из комбинаций которых и построены нейрональные нАХР. Некоторые субъединицы ($\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$) могут входить в состав как гомопентамерных ($\alpha 7_5$, $\alpha 9_5$), так и гетеропентамерных рецепторов ($\alpha 7\alpha 8$, $\alpha 7\beta 2$, $\alpha 9\alpha 10$), остальные субъединицы формируют гетеропентамерные каналы, например, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 6\beta 2\beta 3$ и др. [15-19]. Между типами субъединиц (α , β , γ , δ , ϵ) наблюдается 20 – 30% гомологии аминокислотных последовательностей и 70% гомологии внутри типов [20]. Аминокислотный состав

субъединиц одного типа (например, $\alpha 3$) более чем на 80% идентичен среди позвоночных [21].

NC-IUPHAR рекомендует продолжать использовать для nAХР номенклатуру, основанную на употреблении греческих букв, но отказаться от терминов «нейрональный», «мышечный», а также ганглионарный/автономный nAХР [14]. Поводом к этому служит распространенность рецепторов одного типа, например, $(\alpha 7)_5$ nAХР, в разных клетках и тканях: на нервных и глиальных клетках ЦНС, эпителиальных клетках, иммунных клетках и т.д.

Впоследствии на основании ряда структурных и функциональных особенностей nAХР стали относить к лиганд-управляемым ионным каналам, семейству Cys-петельных рецепторов. Эти рецепторы в ответ на воздействие лиганда (нейромедиатора) претерпевают конформационные перестройки, приводящие к открытию трансмембранного канала, переносу ионов и изменению мембранного потенциала [22, 23]. Другими представителями этого семейства являются рецепторы γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) и глицина, один тип рецепторов серотонина (5-НТ3 рецепторы), глутамат- и серотонин-управляемые хлорные каналы беспозвоночных, Zn^{2+} -активируемые каналы [14, 22, 23]. Все они являются пентамерными белковыми комплексами, каждая субъединица которых включает относительно гидрофильный внеклеточный N-концевой домен (приблизительно 200 аминокислотных остатков) с короткой консервативной Cys-петлей, ограниченной дисульфидной связью (13 аминокислотных остатков), которая и дала название этому семейству рецепторов (Рис. 3.1, 3.2). Далее следуют три гидрофобных трансмембранных фрагмента М1 – М3 (М2 выстилает ионный канал), протяжённая внутриклеточная петля и четвертый трансмембранный фрагмент М4 (Рис. 3.1, 3.2) (подробнее см. раздел 3.2 Строение Cys-петельных рецепторов) [22, 23]. Таким образом, обе N- и С-концевые аминокислотные последовательности белка оказываются с наружной стороны цитоплазматической мембраны. Наблюдается тенденция пересмотра структурных особенностей, присущих Cys-петельным рецепторам. Так, прокариотические лиганд-управляемые ионные каналы, которые считаются предшественниками известных Cys-петельных рецепторов, не содержат ни цитоплазматической, ни консервативной Cys-петель, хотя в остальном их вторичная и третичная структуры высокомологичны остальным представителям данного семейства (Рис. 3.2) [24, 25].

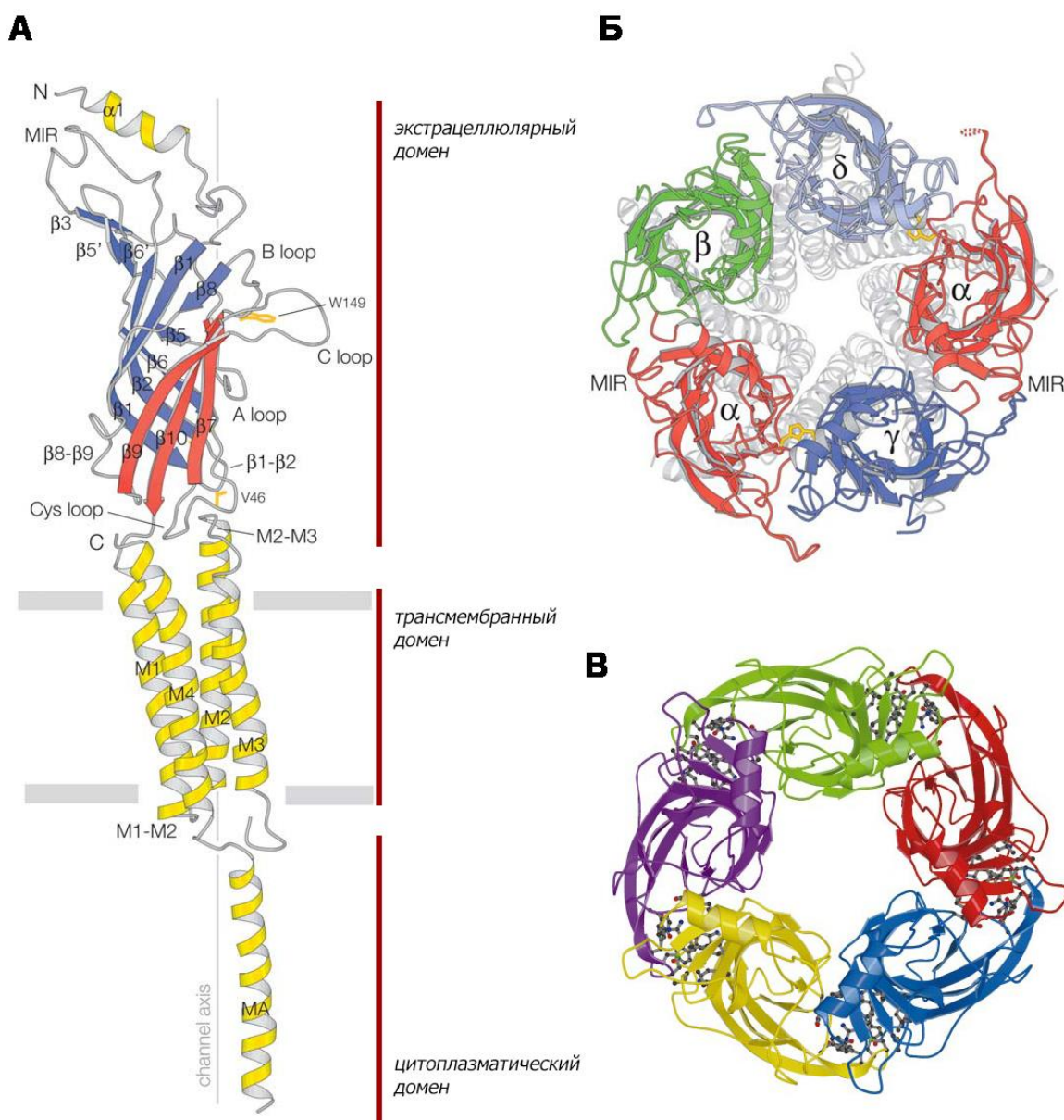


Рис. 3.1 – Пространственное строение никотинового ацетилхолинового рецептора *Torpedo* [26] и ацетилхолинсвязывающего белка *Lymnaea stagnalis* [27].

а) Пространственная структура α -субъединицы нАХР *Torpedo* с разрешением 4Å, установленная методом электронной микроскопии и дополнительно обработанная математически для увеличения разрешения. Приведены обозначения структурных доменов нАХР, а также элементов вторичной структуры нАХР (α -спиралей, β -слоев и соединяющих их петель).

б) Электронно-микроскопическая структура (разрешение 4Å) пентамерного нАХР мышечного типа *Torpedo* (вид со стороны синаптической щели, субъединицы рецептора показаны разными цветами).

в) Кристаллическая структура ацетилхолинсвязывающего белка (АХСБ) *Lymnaea stagnalis*, вид сверху; идентичные протомеры показаны разными цветами, в области их контакта видны лиганд-связывающие сайты.

Никотиновые, серотониновые, бактериальные Cys-петельные рецепторы проницаемы для ионов Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , что обеспечивается суммарным отрицательным зарядом на поверхности внешнего и внутреннего вестибюлей канала, а также кольцом отрицательных зарядов, расположенным близко к внутриклеточному концу M2, которое выполняет роль селективного фильтра (см. раздел 3.2 Строение Cys-петельных рецепторов) [23, 26, 28, 29]. У анион-селективных членов семейства (рецепторов ГАМК, глицина и др.) наблюдается аналогичное распределение положительных зарядов на протяжении вестибюля канала.

3.2 Строение Cys-петельных рецепторов

nAChR и другие Cys-петельные рецепторы представляют собой пентамерные интегральные аллостерические мембранные белки с молекулярной массой около 290 кДа, пять идентичных или гомологичных субъединиц которых расположены симметрично вокруг ионного канала (Рис. 3.1А, Б) [23, 30]. В составе каждой субъединицы (Рис. 3.1А) выделяют три домена: внеклеточный лиганд-связывающий домен (образован десятью β -слоями, α -спиралью и несколькими петлями (А, В, С, $\beta 1$ – $\beta 2$, Cys-петлями)), трансмембранный домен (включает гидрофобные α -спиральные сегменты M1 – M4 и петли M1 – M2 и M2 – M3) и весьма изменчивый внутриклеточный домен (длинная петля M3–M4 с α -спиралью MA на С-конце), который отсутствует у прокариотических представителей лиганд-управляемых ионных каналов (Рис. 3.2) [26].

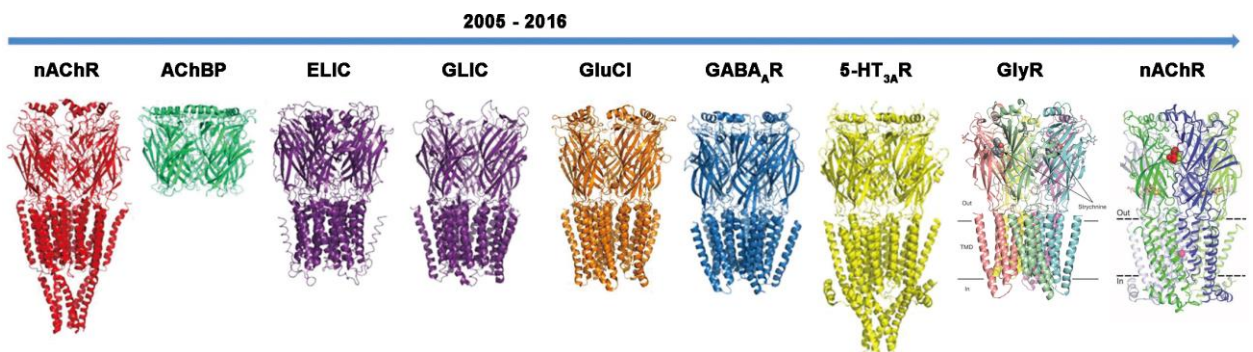


Рис. 3.2 – Пространственные структуры Cys-петельных рецепторов, установленные методами рентгеноструктурного анализа и электронной микроскопии с 2005 по 2016 г. (расположены в хронологическом порядке). Слева направо приведены: электронно-микроскопическая структура nAChR мышечного типа ската *Torpedo marmorata* (nAChR), кристаллическая структура ацетилхолинсвязывающего белка (AChBP) *Lymnaea stagnalis*, прокариотических лиганд-связывающих ионных каналов *Erwinia chrysanthemi* (ELIC) и *Gloeobacter violaceus* (GLIC), глутамат-управляемого хлорного канала *Caenorhabditis elegans* (GluCl), ГАМК_A-рецептора человека (GABA_AR), серотонинового 5-НТ_{3A} рецептора мыши (5-НТ_{3A}R), глицинового $\alpha 3$ рецептора человека (GlyR) и $\alpha 4\beta 2$ nAChR человека (nAChR) [31-33].

Первоначальной моделью пространственной структуры внеклеточного домена Cys-петельных рецепторов служила кристаллическая структура секретируемого глиальными клетками ацетилхолинсвязывающего белка (АХСБ) пресноводного моллюска *Lymnaea stagnalis* (Рис. 3.1В, 3.2) [27, 34]. Этот водорастворимый белок по структуре и размерам гомологичен внеклеточному домену гомопентамерного nАХР, содержит известные консервативные аминокислотные остатки и способен с высоким сродством взаимодействовать с лигандами Cys-петельных рецепторов [27, 35]. Позднее были обнаружены АХСБ морского моллюска *Aplysia californica* [36] и пресноводного моллюска *Bulinus truncates* [37]. Пространственные структуры трех перечисленных АХСБ оказались весьма схожими, хотя гомология их аминокислотных последовательностей составляет лишь 20 – 40%. Кристаллические структуры АХСБ, в том числе в комплексе с различными лигандами, позволили подробно изучить строение ортостерических лиганд-связывающих участков Cys-петельных рецепторов (см. раздел 3.2.5 Лиганд-связывающие участки) [27, 37-40].

Вслед за появлением ряда кристаллических структур комплексов АХСБ с агонистами и антагонистами nАХР методом электронной микроскопии была установлена структура никотинового рецептора мышечного типа ската *Torpedo* (Рис. 3.1А, Б, 3.2) [26]. Позднее методом рентгеноструктурного анализа удалось разрешить кристаллические структуры полноразмерных прокариотических лиганд-управляемых ионных каналов *Erwinia chrysanthemi* (ELIC) [41] и *Gloeobacter violaceus* (GLIC) [42, 43], а затем были опубликованы структуры ряда эукариотических Cys-петельных рецепторов: глутамат-управляемого хлорного канала *Caenorhabditis elegans* (GluCl) [44], 5HT₃ серотонинового рецептора мыши [45], ГАМК_A-рецептора человека [46], $\alpha 3$ глицинового рецептора человека [33], а также $\alpha 4\beta 2$ nАХР человека [31] (Рис. 3.2).

Совокупность имеющихся структурных данных хорошо иллюстрирует, что лиганд-связывающие сайты Cys-петельных рецепторов и их ионные каналы расположены весьма удаленно друг от друга, что придает этим рецепторам типичные черты аллостерического мембранного белка. Также можно проследить высокую гомологичность (вплоть до атомного уровня) пространственной структуры всех представителей Cys-петельных рецепторов, что указывает на общее филогенетическое происхождение как прокариотических рецепторов, так и рецепторов нейромедиаторов человека.

3.2.1 Внеклеточный домен

Сравнение кристаллических структур родственных прокариотических и эукариотических лиганд-управляемых ионных каналов и АХСБ (Рис. 3.2) показывает, что структура внеклеточного домена представляет собой высококонсервативный иммуноглобулино-подобный β -сендвич, стабилизированный внутренними гидрофобными взаимодействиями. В его составе различают внутренние и наружные β -слои, обозначенные на Рис. 3.1А синим и красным цветом, соответственно [26]; соединяющие их петли, также как и N-концевая α -спираль (отсутствующая у прокариотических белков) довольно разнообразны как по длине, так и по структуре. До настоящего времени роль N-концевой α -спирали, удвоенной в $\beta 3$ ГАМК_A-рецепторе [46], остается неизвестной [47]. Все субъединицы Cys-петельных рецепторов (за исключением рецепторов прокариот) несут высококонсервативную гидрофобную Cys-петлю, соединяющую $\beta 6$ и $\beta 7$ -слои (Рис. 3.1А), которая ограничена дисульфидной связью (Cys₁₂₈ – Cys₁₄₂ в $\alpha 1$ -субъединице) [48]. Внеклеточный домен субъединиц Cys-петельных рецепторов в большей или меньшей степени гликозилирован [48-51]. Внутри прокариотического канала GLIC в открытом состоянии (кристаллическая структура с разрешением 2,4 Å) обнаружили упорядоченные структуры (пятиугольники), построенные из молекул воды на уровне двух колец гидроксильрованных аминокислотных остатков Ser 60 и Thr 20. Считается, что эти остатки важны для ионной селективности рецептора [52]. Во внеклеточном домене на в области контакта субъединиц Cys-петельных рецепторов расположен ортостерический лиганд-связывающий участок (см. раздел 3.2.5.1 Ортостерический лиганд-связывающий участок), с которым взаимодействуют агонисты и конкурентные антагонисты рецепторов.

3.2.2 Трансмембранный домен

Строение высококонсервативного трансмембранного домена Cys-петельных рецепторов можно рассмотреть на примере nАХР. Так, большая часть трансмембранного фрагмента М1 находится в α -спиральной конформации [26], однако его N-концевая часть составляет сайт связывания неконкурентных ингибиторов и не входит в спираль.

Пять трансмембранных фрагментов М2 формируют ионный канал nАХР, М1 и М3 образуют их ближайшее окружение, тогда как наиболее удаленные от центральной оси фрагменты М4 создают внешнюю поверхность рецептора на границе с липидным окружением [22, 26, 53, 54]. Как и следует ожидать исходя из их функции, трансмембранные фрагменты М1, М2, М3 высокоомологичны для всех субъединиц

нАХР. Фрагмент М4 наименее консервативен среди всех трансмембранных фрагментов, однако мутации в его последовательности оказывают сильный эффект на ион-транспортные характеристики рецептора. Данные молекулярной динамики показывают, что М4 может воспринимать изменения мембранного окружения нАХР и передавать информацию фрагменту М2, влияя на функционирование канала [55].

Во взаимодействии внутриклеточного и трансмембранного доменов принимают участие не только С-конец $\beta 10$ -слоя и N-конец фрагмента М1, связанные ковалентно, но и нековалентные связи между петлями $\beta 1/\beta 2$ и $\beta 6/\beta 7$ (Cys-петля) внеклеточного домена и М2-М3 линкером в составе трансмембранного домена (Рис. 3.1А) [56, 57]. В трансмембранном домене расположен ряд аллостерических участков связывания различных позитивных и негативных модуляторов рецепторов (см. разделы 3.2.5.3 Аллостерические участки связывания лигандов и 3.7.3 Позитивные аллостерические модуляторы нАХР).

3.2.3 Химерные белки

Из рисунка 3.2 видно, насколько консервативны пространственные структуры внеклеточного и трансмембранного доменов Cys-петельных рецепторов и их прокариотических предшественников [47, 58]. Наблюдаемое структурное сходство подтверждается при конструировании функциональных химерных белков, содержащих внеклеточный домен $\alpha 7$, $\alpha 4$ или $\beta 2$ субъединиц нАХР, совмещенный с трансмембранным доменом серотонинового 5HT₃ рецептора [59, 60] или $\alpha 1$ глицинового рецептора [61]. Также функциональным оказался химерный белок, содержащий внеклеточную часть бактериального рецептора GLIC и трансмембранный и цитоплазматический домены эукариотического $\alpha 1$ глицинового рецептора [62]. При создании химерной конструкции между прокариотическим каналом ELIC и $\alpha 7$ нАХР человека была показана важная роль соответствия взаимодействующих частей внеклеточного и трансмембранного доменов для получения функционального химерного рецептора [63].

3.2.4 Внутриклеточный домен

Большая часть внутриклеточного домена между трансмембранными фрагментами М3 и М4 экспонирована в цитоплазму, его длина (от 70 до 150 аминокислотных остатков) и аминокислотная последовательность довольно сильно различаются как между различными Cys-петельными рецепторами, так и между отдельными субъединицами

рецепторов [23, 45, 64]. Внутриклеточный домен важен для выхода пентамерных белковых комплексов на поверхность клетки и правильного их расположения в районе синапса [65, 66], а также для кинетических характеристик рецептора и его проводимости [67]. Мутации в аминокислотной последовательности внутриклеточного домена приводят к изменениям электрофизиологических свойств нАХР, а также способности субъединиц собираться в функциональный пентамерный комплекс [68-71]. Этот домен важен для направленного транспорта нАХР внутри нейронов [72]. В состав внутриклеточного домена входят многочисленные сайты фосфорилирования для различных киназ (протеинкиназы А, протеинкиназы С, тирозин-киназы) [73, 74], регулирующих активность нАХР [75], их взаимодействие с белками цитоскелета [76] и эффективность их экспрессии [77, 78]. Также во внутриклеточном домене (по крайней мере $\alpha 7$ нАХР) предполагается наличие сайтов связывания ряда белков, которые способны запускать сигнальные внутриклеточные каскады, что объясняет метаботропный путь сигнализации нАХР в невозбудимых клетках, таких как клетки иммунной системы [64].

До настоящего времени удалось установить структуру только части внутриклеточного домена: петли, следующей за М3 трансмембранным фрагментом, и переходящей в короткий α -спиральный участок МХ, а также α -спирального фрагмента МА, примыкающего к трансмембранному сегменту М4 [26, 45]. Остальная часть внутриклеточного домена неупорядочена. В целом, внутриклеточный домен образует цитоплазматический вестибюль рецептора, однако имеющейся структурной информации пока недостаточно для точного определения механизма выхода из него ионов [45].

3.2.5 Лиганд-связывающие участки

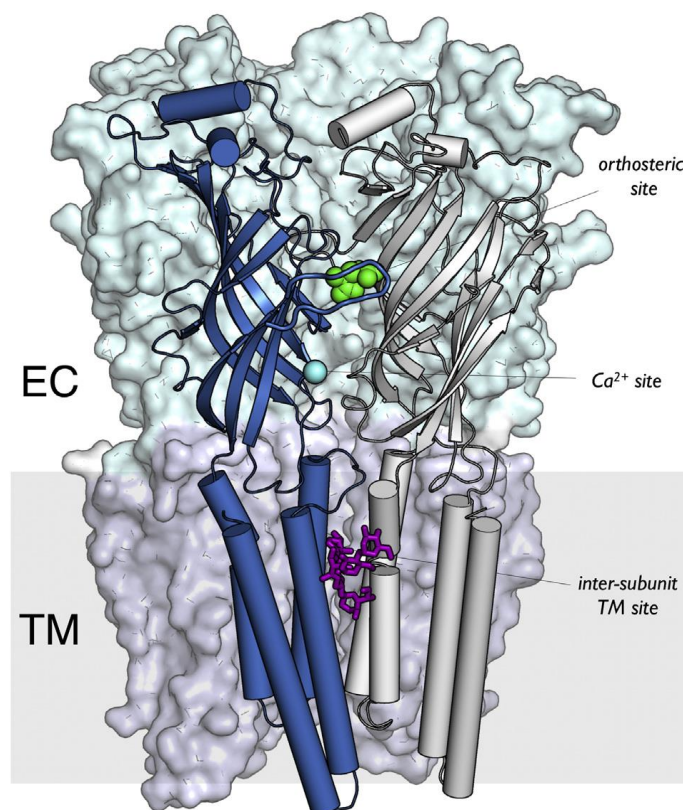


Рис. 3.3 – Лиганд-связывающие сайты Cys-петельных рецепторов на примере пространственной структуры GluCl [44]. Подробно показаны элементы пространственного строения внеклеточного и трансмембранного доменов двух субъединиц GluCl, в области контакта которых расположен ортостерический лиганд-связывающий сайт агонистов/конкурентных антагонистов. «Основная» сайт-образующая субъединица окрашена синим цветом, «комплементарная» – серым цветом. В ортостерическом сайте связывания расположена молекула эндогенного агониста L-глутамата (зеленый цвет). Также показан межсубъединичный трансмембранный сайт связывания позитивных аллостерических модуляторов, в котором расположена молекула ивермектина (фиолетовый цвет). Сайт связывания двухвалентных ионов, модулирующих активность ряда Cys-петельных рецепторов, показан в виде голубой сферы близко к границе внеклеточного и трансмембранного доменов.

3.2.5.1 Ортостерический лиганд-связывающий участок

В лиганд-управляемых ионных каналах участок связывания нейромедиатора (или ортостерический лиганд-связывающий участок) располагается во внеклеточном домене в области контакта субъединиц (Рис. 3.1, 3.3). Он сформирован тремя петлями А, В и С «основной» субъединицы и четырьмя петлями D, E, F и G соседней с ней «комплементарной» субъединицы (Рис. 3.1, 3.4). α -Субъединицы nAХР являются «основными» при формировании ортостерического участка, т.о. мышечный nAХР (Рис. 3.1А, Б), имеющий в своем составе две α -субъединицы, обладает двумя сайтами

связывания. Они характеризуются различным сродством к конкурентным антагонистам, таким как *d*-тубокурарин. Стехиометрию рецептора мышечного типа можно представить как $\alpha_v\text{-}\gamma\text{-}\alpha_n\text{-}\delta\text{-}\beta$, где В и Н обозначают высоко- и низкоаффинные сайты связывания лиганда, соответственно [26, 79]. Следуя той же логике, в гомопентамерных $\alpha 7$ рецепторах представлено пять идентичных лиганд-связывающих участков [27].

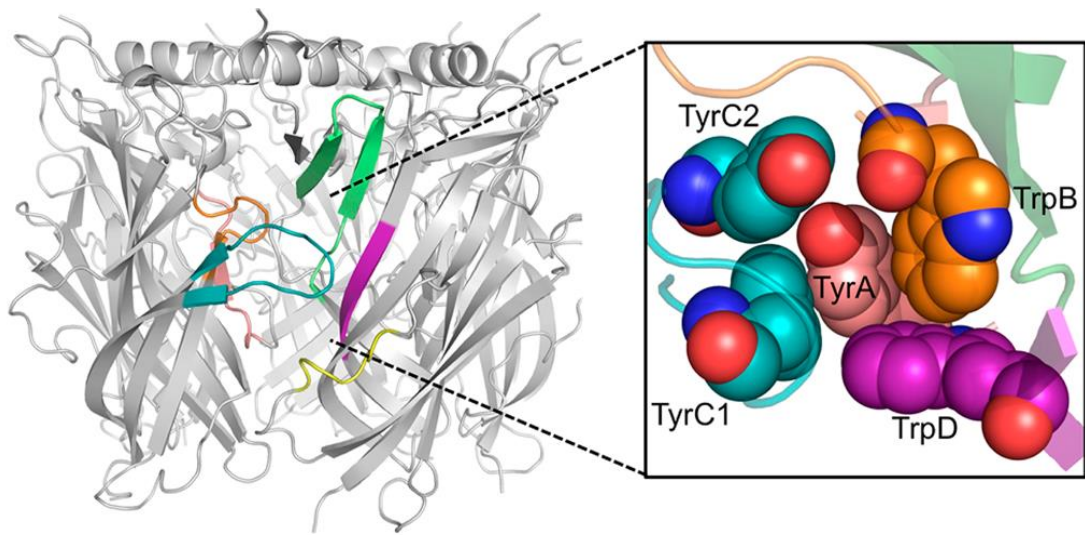


Рис. 3.4 – Пространственная структура ацетилхолинсвязывающего белка *Lumnaea stagnalis* (вид сбоку, PDB код 1UW6). Разными цветами обозначены петли «основного» (петля А бледно-красного цвета, петля В оранжевого цвета, петля С цвета морской волны) и «комплементарного» (петля D фиолетового цвета, петля Е зеленого цвета, петля F желтого цвета) протомера, образующие ортостерический лиганд-связывающий сайт. В рамке детально показано расположение высококонсервативных ароматических аминокислотных остатков ортостерического лиганд-связывающего сайта.

Кристаллические структуры ортостерических сайтов были опубликованы для АХСБ (Рис. 3.1В, 3.4) [27], каналов GLIC [42, 43], ELIC [41], GluCl (Рис. 3.3) [44] и ГАМК_A-рецептора [46]. В нАХР *Torpedo* и в АХСБ аминокислотные остатки петель А (Тур), В (Трп), С (два Тур) и D (Трп) образуют плотную ароматическую «коробку» вокруг четвертичной аммониевой группы ацетилхолина (Рис. 3.1А, 3.4) [26, 38]. При связывании с GluCl рецептором аминогруппа эндогенного агониста L-глутамата взаимодействует с соответствующими ароматическими остатками петель А (Phe), В (Тур) и С (Тур) «основной» субъединицы, в то время как боковая карбоксильная группа образует солевые мостики с остатками Arg и Lys петель D и F комплементарной субъединицы (Рис. 3.3) [44]. В $\beta 3$ ГАМК_A-рецепторе ортостерический участок образован четырьмя ароматическими остатками петель В (Тур), С (Тур, Phe) и D (Тур) совместно с остатком

Glu155, образующим верхнюю границу кармана связывания и участвующим в активации рецептора [80]. Аналогичные взаимодействия лежат в основе активации nAХР [46, 81].

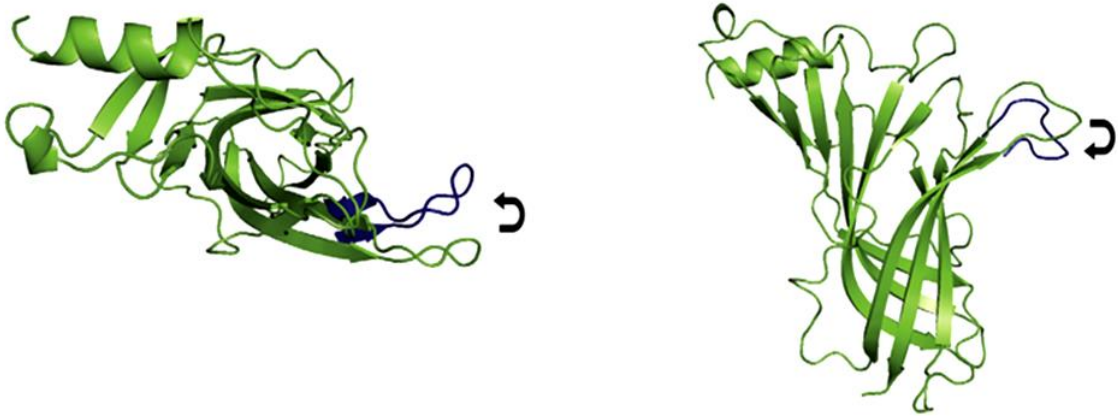


Рис. 3.5 – Движение петли С протомера ацетилхолинсвязывающего белка *Aplysia californica* при связывании лигандов (обозначено стрелкой). Показаны вид сверху (слева) и вид сбоку (справа) [82].

Важную роль при связывании лигандов в ортостерическом участке играет движение петли С (Рис. 3.5). Связывание небольших молекул агонистов nAХР, таких как никотин, приводит к приближению петли С к центральной оси рецептора и образованию более компактной структуры лиганд-связывающего кармана [27, 37-40, 82, 83]. Такое движение петли С индуцирует ротационное смещение β 10 тяжа, движение которого впоследствии передается трансмембранным сегментам М2 и М3 [84]. При связывании молекул большего размера, такие чаще всего встречаются среди антагонистов nAХР, петля С отодвигается от центральной оси рецептора, увеличивая объем лиганд-связывающей полости. В прокариотическом канале ELIC ортостерический участок связывания лигандов также образован рядом ароматических аминокислотных остатков и расположен в области контакта субъединиц, что было показано при кристаллизации его комплекса с агонистом бромпропиламином [85] и антагонистом ацетилхолином [86]. При связывании ацетилхолина наблюдалось характерное движение петли С и небольшое расширение ионной поры в трансмембранном домене [86].

3.2.5.2 Канальные связывающие центры

Блокаторы ионного канала – важная терапевтически значимая категория лигандов nAХР (см. раздел 3.7.2.2 Неконкурентные антагонисты nAХР). Они связываются в трансмембранном домене nAХР и стерически препятствуют прохождению ионов через

канал [87, 88]. Ранние эксперименты по фотоаффинному мечению nAХР с использованием таких блокаторов ионного канала как хлорпромазин [89] или триметилфенилфосфоний [90] выявили ключевые для их связывания аминокислотные остатки в сегменте M2 (позиции 20, 60, 90, 130 and 20' [28]). Обнаруженные ключевые остатки находились на той стороне M2, которая обращена к ионной поре. Участки связывания блокаторов ионного канала распределены на протяжении трансмембранного домена: от «ворот» канала, располагающихся приблизительно посередине этого домена, до входа в селективный фильтр на границе с цитоплазматической частью рецептора. Анализ недавних кристаллических структур продемонстрировал значительную консервативность строения трансмембранной ионной поры как прокариотических, так и эукариотических представителей лиганд-управляемых ионных каналов [91], включая гомологичные сайты связывания блокаторов и кольца заряженных аминокислотных остатков.

3.2.5.3 Аллостерические участки связывания лигандов

В дополнение к каноническому ортостерическому лиганд-связывающему участку, располагающемуся в области контакта субъединиц во внеклеточном домене, найдены аллостерические участки связывания различных веществ (Рис. 3.3), объединяемых в группу аллостерических модуляторов Cys-петельных рецепторов (см. раздел 3.7.3 Позитивные аллостерические модуляторы (ПАМ) nAХР) [91, 92]. Данная группа весьма разнородна, включает стероиды [93], анестетики [94], амины [95, 96], жирные кислоты и каннабиноиды [97], катионы [98, 99] и др. Данные вещества способны положительно или отрицательно влиять на функционирование лиганд-управляемого ионного канала, активированного связыванием агониста. Сами по себе аллостерические модуляторы не оказывают агонистического или антагонистического действия. Аллостерические сайты связывания могут располагаться во внеклеточном, трансмембранном или внутриклеточном доменах рецептора [100-102]. В данный момент идут активные исследования сайтов связывания и механизма действия аллостерических модуляторов Cys-петельных рецепторов для последующей разработки на их основе лекарственных препаратов. Так, галантамин, который является позитивным аллостерическим модулятором $\alpha 7$ и $\alpha 4\beta 2$ nAХР человека (см. раздел 3.7.3 Позитивные аллостерические модуляторы (ПАМ) nAХР), применяется для лечения болезни Альцгеймера [103-105]. Связывание галантамина в гетеромерных nAХР происходит в области контакта субъединиц, исключая границу α -субъединицы, где расположен ортостерический участок

связывания лигандов [106]. Интересно, что данное вещество для мышечного типа nAХР является частичным агонистом [96], но не способно конкурировать за связывание с ацетилхолином.

Сайт-направленный мутагенез позволил идентифицировать сайты связывания ионов Ca^{2+} , являющихся позитивными аллостерическими модуляторами нейрональных nAХР, во внеклеточном домене $\alpha 7$ рецептора на границе с его трансмембранной частью (Рис. 3.3) [107]. В структуре прокариотических каналов ELIC и GLIC были обнаружены гомологичные сайты, вероятно, способные взаимодействовать с двухвалентными катионами, негативно модулирующими активность ELIC [85], и с какими-то неизвестными лигандами GLIC [108].

Очень важный сайт аллостерической регуляции Cys-петельных рецепторов был идентифицирован в трансмембранном домене. Мутации в трансмембранном домене $\alpha 7$ nAХР изменяли способность ивермектина, антипаразитарной лекарственной субстанции, усиливать ацетилхолин-индуцированный ответ $\alpha 7$ nAХР [109]. Позже было показано, что ряд позитивных синтетических модуляторов $\alpha 7$ nAХР, таких как PNU 120596 и LY 2087101, взаимодействуют с тем же аллостерическим сайтом [101, 110-112]. Ивермектин способен связываться и вызывать активацию GluCl рецептора в отсутствие эндогенного нейромедиатора. Кристаллическая структура этого комплекса показала, что ивермектин-связывающий сайт расположен на периферии трансмембранного домена GluCl рецептора в области контакта субъединиц (Рис. 3.3) [44]. Приблизительно такое же расположение имеет участок связывания молекулы спирта в GLIC [113], который консервативен для глициновых и ГАМК_A-рецепторов человека и включает ранее идентифицированные аминокислотные остатки, важные для влияния спирта и анестетиков на соответствующие рецепторы [114, 115].

Ранние попытки реконструировать nAХР в липидных везикулах показали, что композиция мембраны сильно отражается на активности этих рецепторов [116]. Для ГАМК_A-рецепторов подобное заключение было сделано при изучении гиппокампальных нейронов крыс [117]. Так, в отсутствие анионных липидов и холестерина, большая часть никотиновых ацетилхолиновых рецепторов находится в так называемой «разъединенной» (англ. “uncoupled”) конформации [118]. Находясь в этом состоянии, рецептор связывает агонисты, но утрачивает способность подвергаться необходимым конформационным изменениям для открытия ионного канала. Недавние структурные исследования предполагают, что в этой конформации М4 отделен от остальных трансмембранных фрагментов рецептора и нековалентные взаимодействия между внеклеточным и

трансмембранным доменом утрачены [119]. В согласии с предыдущими функциональными данными компьютерный анализ кристаллических структур нАХР мышечного типа *Torpedo*, ГАМК_A-рецептора, GluCl рецептора и GLIC показывает наличие ряда полостей в трансмембранном домене для связывания липидов и холестерина, которые могут модулировать работу канала [119-121].

Анестетики, такие как пропофол и десфлуран являются позитивными и негативными аллостерическими модуляторами для эукариотических ГАМК_A-рецепторов [115] и прокариотических ионных каналов GLIC [122]. Кристаллическая структура комплексов GLIC с пропофолом и десфлураном выявила наличие полости для их связывания внутри верхней части трансмембранного домена субъединицы, образованной фрагментами M1, M2 и M3 [100].

Также ряд аллостерических сайтов связывания, важных для сборки, стабилизации и функционирования рецепторов, представлен во внутриклеточном домене рецептора (см. обзоры [123, 124]).

3.3 Функционирование нАХР

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы являются аллостерическими белками, которые имеют несколько конформационных состояний. Функциональные (конформационные) состояния нАХР довольно разнообразны, их можно поделить на состояние покоя (ионный канал закрыт), активные (ионный канал открыт) и десенситизированные (ионный канал закрыт) (Рис. 3.6, *верхняя панель*). Даже при отсутствии агониста нАХР спонтанно может переходить в любое из этих состояний, при связывании же одной или двух молекул агониста, вероятность открытого или десенситизированного состояния рецептора повышается (Рис. 3.6, *средняя панель*) [125]. На рисунке 3.6 (*верхняя панель*) показана наиболее простая схема конформационных перестроек, происходящих при переходе между этими состояниями. В состоянии покоя при отсутствии связывания агониста петля С, которая расположена над ортостерическим сайтом связывания лигандов, отодвинута от центральной оси рецептора (находится в «апоконформации») [40], а Cys-петля приближена к короткой внеклеточной петле (ECL) между трансмембранными доменами M2 и M3. При связывании агониста происходит ряд конформационных энергетически выгодных перестроек, что приводит к приближению петли С к лиганду и размыканию парных аминокислотных взаимодействий, которые стабильны в состоянии покоя [126]. Это дает толчок для волны конформационных изменений, которые передаются через движение ряда β-слоев внеклеточного домена

нАХР, приводя к непосредственному взаимодействию Cys-петли и петли ECL [42-44, 57, 127, 128]. Это уже в свою очередь запускает передвижение трансмембранных доменов (сначала М2, затем М4 и М3), результатом чего является формирование и открытие ионного канала [42-44, 57, 127, 128]. Таким образом, сначала происходит компактизация экстрацеллюлярного домена в направлении ионного канала для открытия ворот канала, а затем согласованный поворот для стабилизации активного открытого состояния канала.

Однако активное состояние рецептора по своей природе нестабильно и энергетически выгоден переход в непроводящее десенситизированное состояние за счет дальнейших конформационных перестроек. Некоторые конформационные изменения сохраняются в лиганд-связывающем домене десенситизированных рецепторов, что выражается в высоком сродстве агонистов и антагонистов к нАХР, находящемуся именно в этом состоянии.

Средняя панель рисунка 3.6 демонстрирует гипотетические энергетические траектории перехода рецептора между разными конформационными состояниями. Показаны варианты спонтанных переходов при отсутствии лиганда, а также при связывании рецептором одной или двух молекул агониста. Гетеромерные нАХР имеют два сайта связывания агониста и равновесие конформационных состояний рецептора будет зависеть от количества связанных молекул агониста. Электрофизиологические исследования единичных мышечных [129] и нейрональных нАХР [130] выявили существование как минимум двух открытых состояний рецепторов, которые отличаются своей стабильностью/длительностью. При низких концентрациях агониста регистрируемые ионные токи весьма кратковременны (соответствует O^* открытому состоянию канала), в то время как при более высоких концентрациях агониста наблюдаются более продолжительные события (соответствует O' открытому состоянию канала). Сначала предполагали, что кратковременные токи продуцируют рецепторы, связавшие только одну молекулу агониста [129]. Однако более поздние электрофизиологические эксперименты, проведенные для рецепторов с одним активируемым сайтом, регистрировали как кратковременные, так и длительные события [131].

Как видно из рисунка 3.6 (*средняя панель*), наиболее стабильным конформационным состоянием для рецепторов, не связанных с лигандами, является состояние покоя, при котором канал закрыт. При этом вероятность перехода канала в открытое состояние весьма низка и приблизительно один из ста рецепторов будет находиться в десенситизированном состоянии [125]. Для рецепторов, связанных с агонистами, барьеры

перехода из состояния покоя в открытые состояния сглажены, а также весьма высока вероятность десенситизированного состояния нАХР, особенно при связывании двух молекул агониста.

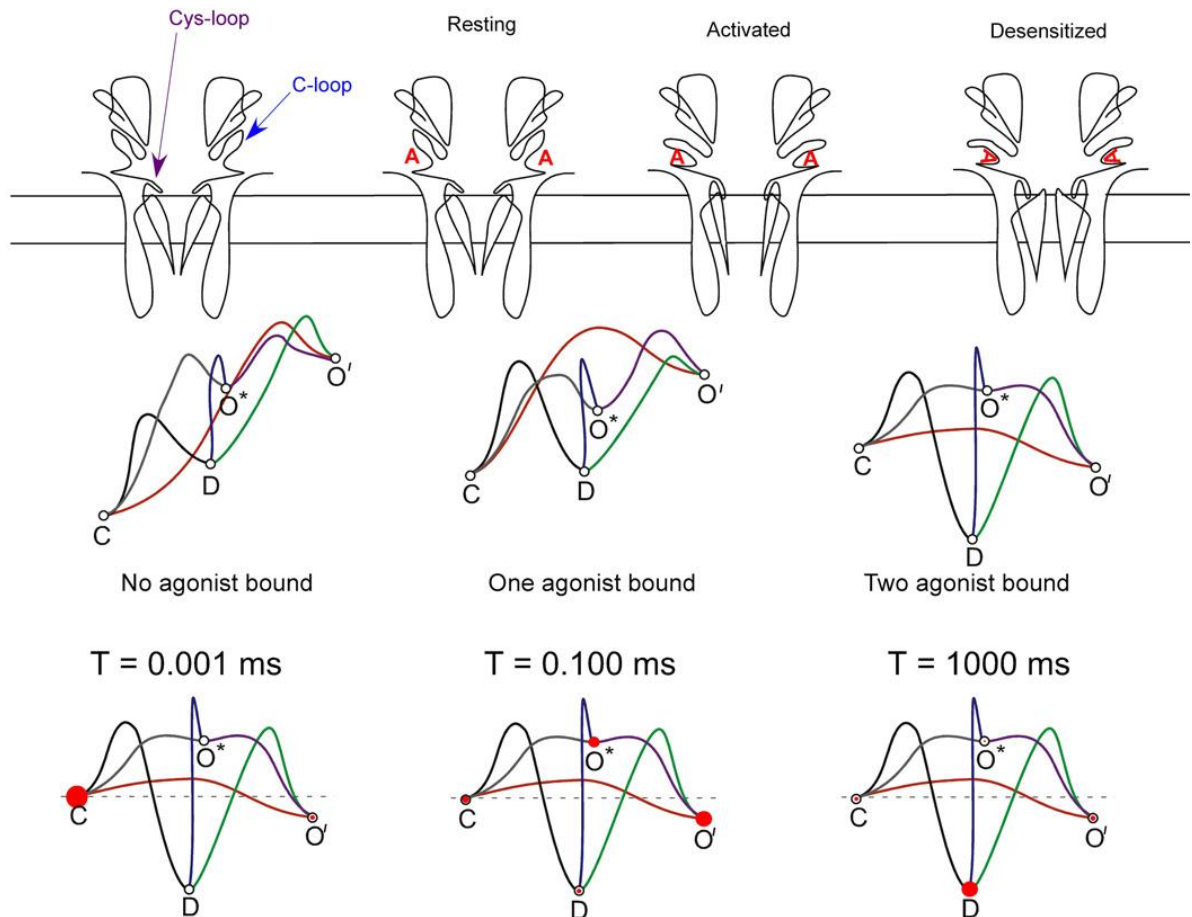


Рис. 3.6 – Модели перехода гетеромерных нАХР из состояния покоя в активированное и десенситизированное состояния [125]. На *верхней панели* схематически изображены ключевые конформационные перестройки субъединиц нАХР, характерные для состояния покоя рецептора, активированного и десенситизированного состояний. Молекула агониста условно обозначена буквой А.

Средняя панель демонстрирует графики вероятности нахождения/перехода нАХР в состояние покоя (С), активированные (O* и O' - открытые конформации нАХР при низких и высоких концентрациях агониста, соответственно) и десенситизированное (D) состояния. Показаны графики для свободного рецептора, а также при связывании им одной и двух молекул агониста.

Графики, представленные на *нижней панели*, отражают вероятность нахождения популяции гетеромерных нАХР в том или ином конформационном состоянии в зависимости от времени (0,001 – 1000 мс), прошедшего с момента синхронного синаптического выброса высокой концентрации агониста. Диаметр красного круга обозначает пропорциональную долю популяции нАХР, находящихся в определенном конформационном состоянии.

Тем не менее, концепция равновесия между различными конформационными состояниями нАХР имеет весьма отдаленное отношение к их функционированию при

синаптической передаче. Это связано с тем, что быстрый и синхронный везикулярный выброс большого количества ацетилхолина очень быстро переводит большую популяцию рецепторов из состояния, не связанного с агонистом (левое изображение на средней панели рис. 3.6), в состояние, когда все сайты связывания агонистов заполнены (правое изображение на средней панели рис. 3.6) [132]. Следовательно, при изучении популяции синаптических рецепторов они не проявляют равновесных кинетических свойств. Описанный переход скорее иллюстрирует нижняя панель рисунка 3.6: при высвобождении АХ на короткий промежуток времени многие рецепторы перейдут в активное открытое состояние (*среднее изображение*), а затем они будут довольно синхронно переходить в десенситизированное состояние и оставаться в этом состоянии с большой вероятностью до момента снижения концентрации агониста (*правое изображение*), который будет расщепляться ацетилхолинэстеразой. В нервно-мышечном синапсе вероятность открытия ионного канала nAChR составляет 70–80% в первые несколько миллисекунд после высвобождения нейромедиатора [132]. При длительном же наличии агониста в синаптической щели, только небольшой процент рецепторов будет открыт [129]. Надо отметить очень высокий уровень ацетилхолинэстеразы в базальной мембране нервно-мышечного синапса, расположенной между его пре- и постсинаптическими мембранами. Одна молекула эстеразы приходится приблизительно на 10 молекул nAChR. Было выявлено, что расщепление АХ происходит настолько быстро, что очень мала вероятность повторного связывания с nAChR тех молекул АХ, которые достигают постсинаптической мембраны (около 80% от общего выброса нейромедиатора) [132].

Учитывая результаты исследований мышечных nAChR, для гетеромерных нейрональных nAChR также было обнаружено свойство генерации больших синхронных токов короткой длительности [133]. Особенно хорошо это иллюстрируется при функционировании $\alpha 3$ -содержащих nAChR вегетативных ганглиев. Однако данная модель синхронного открытия большого числа nAChR не является актуальной для активации ацетилхолином гетеромерных nAChR в мозге, а воздействие никотина на эти рецепторы происходит совсем по другому механизму.

Не только связывание никотина рецептором отличается от такового для АХ, но и последующая конформационная динамика этих рецепторов принципиально различна, что можно оценить при проведении электрофизиологических измерений в ооцитах, экспрессирующих $\alpha 4\beta 2$ nAChR [134]. Так, АХ вызывает более сильный и резкий рецепторный ответ, однако ответы на добавление никотина более продолжительны. Хотя

в присутствии никотина десенситизированное состояние $\alpha 4\beta 2$ нАХР очень устойчиво, его малые концентрации вызывают постоянный небольшой ионный ток через мембрану [135, 136]. На рисунке 3.7 показана гипотетическая модель конформационных состояний $\alpha 4\beta 2$ нАХР при связывании никотина по сравнению с таковой при взаимодействии с АХ. Благодаря более высокому энергетическому барьеру для перехода в открытое состояние первоначально наблюдаемый суммарный ионный ток будет меньше, чем для аналогичных условий при воздействии АХ. Однако открытое и десенситизированное состояние нАХР при связывании никотина практически одинаково энергетически выгодны, обеспечивая большую продолжительность ионного тока.

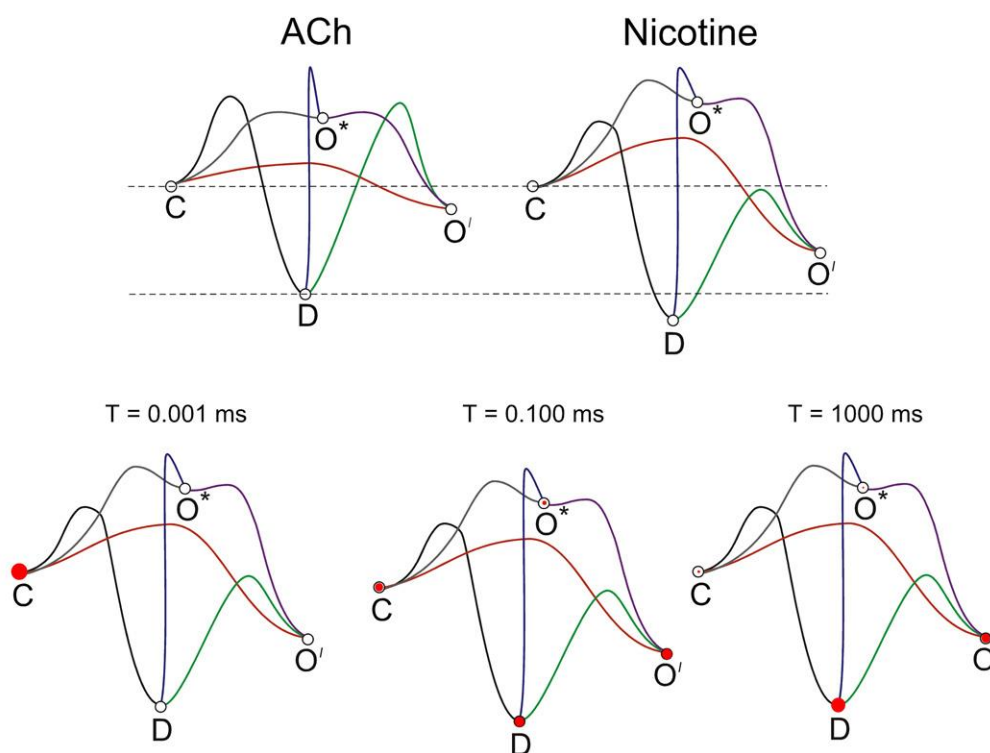


Рис. 3.7 – Модели перехода $\alpha 4\beta 2$ нАХР из состояния покоя в активированное и десенситизированное состояния под действием никотина [125]. Верхняя панель отражает сравнение графиков перехода между конформационными состояниями (С – состояние покоя, O* и O' - открытые конформации $\alpha 4\beta 2$ нАХР при низких и высоких концентрациях агониста, соответственно, D – десенситизированное состояние) под действием никотина и АХ (подробнее см. Рис. 3.6).

Графики, представленные на нижней панели отражают вероятность нахождения популяции $\alpha 4\beta 2$ нАХР в том или ином конформационном состоянии в зависимости от времени (0,001 – 1000 мс), прошедшего с момента резкого повышения концентрации никотина. Диаметр красного круга обозначает пропорциональную долю популяции $\alpha 4\beta 2$ нАХР, находящихся в определенном конформационном состоянии.

Активация нАХР холинергических синапсов нервно-мышечного соединения и вегетативных ганглиев приводит к синхронному ионному току через постсинаптическую

мембрану и генерации распространяющегося потенциала действия. Таким образом, эти нАХР участвуют в быстрой синаптической передаче. Стоит однако учитывать, что это неприменимо для нАХР мозга (особенно при активации никотином), т.к. здесь они сосредоточены в основном пресинаптически, перисинаптически или расположены на телах нейронов, хотя могут присутствовать и на постсинаптической мембране. В мозге АХ выделяется довольно диффузно и скорее является модулятором возбудимости нейронов, регулируя последующий выброс таких нейромедиаторов как глутамат, ГАМК, норэпинефрин, АХ и дофамин [137].

3.4 Мышечный нАХР

Стехиометрия $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ присуща эмбриональному мышечному нАХР, а также рецептору мышечного типа ската *Torpedo* [138]. Во взрослом организме субъединица γ заменяется на ϵ , в результате чего субъединичный состав мышечного нАХР меняется на $(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$ [139, 140]. Субъединицы γ/ϵ и δ совместно с α -субъединицами формируют два лиганд-связывающих сайта мышечного рецептора [141], сродство которых заметно отличается для многих лигандов [142]. (+)-Тубокурарин является известным примером конкурентного антагониста, обладающего большей аффинностью к α_γ сайту по сравнению с α_δ [143]. Связывание АХ с обоими сайтами α_γ и α_δ вызывает конформационные изменения преимущественно в субъединицах $\alpha 1$, которые, передаваясь в трансмембранную область, приводят к открытию канала [144]. Субъединица $\beta 1$ важна для образования кластеров нАХР на постсинаптической мембране нервно-мышечных синапсов [145]. Известно, что плотное расположение мышечных рецепторов в местах нервно-мышечного соединения обеспечивается комплексом белков, которые ответственны за их связь с цитоскелетом [146]. Наиболее изученным подобным белком является рапсин (43 кДа). Установлено, что в дополнение к конститутивному сайту связывания рапсина – амфипатической α -спирали МА (Рис. 3.1А) $\beta 1$ -, $\alpha 1$ - или ϵ -субъединиц [147], существует регулируемый сайт связывания – 382 – 401 аминокислотные остатки внутриклеточной петли $\beta 1$ -субъединицы [148]. Во время развития нервно-мышечного соединения мотонейрон выделяет в синаптическую щель специфический фактор – агрин, который активирует мышечную киназу MuSK [149-151], что приводит к фосфорилированию Tug₃₉₀ цитоплазматической петли β -субъединицы и связыванию второй молекулы рапсина с последовательностью 382-401 [148]. Присоединение второй молекулы рапсина необходимо для кластеризации нАХР в местах нервно-мышечного соединения [147]. Связывание дополнительных молекул рапсина

приводит к стабилизации nAХР в постсинаптической мембране и увеличению числа молекул nAХР, сконцентрированных в синапсе [152, 153]. Также показано, что рапсин связывается с $\alpha 9$ nAХР волосковых клеток улитки уха, что обеспечивает их сгруппированное расположение в цитоплазматической мембране [154]. Посттрансляционные модификации γ и δ -субъединиц (фосфорилирование и гликозилирование, соответственно) необходимы для повышения эффективности формирования пентамерных рецепторных комплексов [155, 156].

3.4.1 Связь мышечного nAХР с заболеваниями

Некоторые мутации в генах, кодирующих субъединицы мышечного nAХР, вызывают преждевременное прекращение трансляция или затрагивают остатки, необходимые для корректного формирования пентамерного рецепторного комплекса. Подобные мутации в ϵ -субъединице обычно компенсируются экспрессией эмбриональной γ -субъединицы. Это характерно для многих хронических неврологических и некоторых воспалительных миогенных расстройств [157].

3.4.1.1 Миастения гравис

Мышечный nAХР является основным аутоантигеном при развитии приобретенного аутоиммунного заболевания Myasthenia gravis [158-161]. Миастения является наиболее распространенным заболеванием, затрагивающим нервно-мышечный синапс; заболевание выявляется с частотой выше, чем 70 случаев на миллион населения [162]. Из-за связывания аутоантител утрачивается значительный пул функциональных мышечных nAХР на постсинаптической мембране, что приводит к патологии нервно-мышечной передачи сигналов и выражается в быстрой утомляемости поперечно-полосатых мышц [158, 160]. Эта патология может затрагивать какую-то определенную группу мышц (например, при глазной форме миастении) или распространяться более широко (при генерализованной форме миастении) [160]. Слабость более выражена в мышцах частого и многократного использования, таких как глазные и лицевые мышцы, результатом может являться птоз верхнего века (аномально низкое положение века) и двойное зрение. Другими часто подверженными заболеванию мышцами являются мышцы конечностей, шеи и плеч. Хотя у $\sim 85\%$ пациентов с миастенией обнаруживаются аутоантитела к мышечному nAХР, около 15% пациентов с генерализованной формой миастении не

имеют подобных антител (серонегативная форма миастении) [163]. У 20 – 40% пациентов с серонегативной формой миастении выявляют аутоантитела к мышечной киназе MuSK [164]. У некоторых групп пациентов также были обнаружены аутоантитела к другим белкам поперечно-полосатых мышц (в основном к титину и риаудиновым рецепторам) [165]. Лечение миастении в настоящий момент осуществляется путем улучшения нервно-мышечной передачи или подавления иммунной системы. Используемые лекарственные препараты включают ингибиторы ацетилхолинэстеразы и стероидные или нестероидные иммунодепрессанты, в наиболее тяжелых случаях также проводится внутривенное введение иммуноглобулинов или плазмаферез. Хирургический подход состоит в удалении тимуса с последующей лекарственной терапией.

При развитии заболевания аутоантитела могут снижать количество функциональных мышечных nAChR по трем механизмам. Во-первых, будучи двухвалентными молекулами, антитела могут связывать nAChR в мышечной постсинаптической мембране, таким образом стимулируя их интернализацию и деградацию. Этот процесс получил название антигенная модуляция. Вторым, и, вероятно, наиболее важным механизмом является комплемент-опосредованный очаговый лизис постсинаптической мембраны. Реакция антител с мышечным nAChR может вызывать активацию комплемента, что приводит к местному разрушению постсинаптической мембраны мембраноатакующим комплексом системы комплемента. В-третьих, антитела против лиганд-связывающего сайта мышечного nAChR могут напрямую блокировать связывание ацетилхолина рецептором [166, 167].

При миастении более половины аутоантител против мышечного nAChR направлены к его главному иммуногенному участку (main immunogenic region, MIR) (Рис. 3.1Б) [167]. В настоящее время установлено, что MIR - это не один эпитоп, а скорее скопление перекрывающихся конформационно-зависимых эпитопов, расположенных в области внеклеточного домена $\alpha 1$ субъединицы, которая наиболее удалена от поверхности клеточной мембраны. Аминокислотные остатки 67 – 76 образуют ядро этого иммуногенного участка. Вероятно, легкая доступность данной области из внеклеточного пространства и определяет ее сильные иммуногенные свойства [27, 168].

3.4.1.2 Врожденные миастенические синдромы

Врожденные миастенические синдромы (CMS) являются сильно гетерогенной группой наследственных расстройств, характеризующихся патологией нервно-мышечной передачи, приводящей к мышечной слабости. Причиной этих заболеваний могут являться

как разнообразные генетические мутации в последовательностях субъединиц мышечного nAChR, так и мутации в других белках нервно-мышечного синапса [169-172]. Энгель [172, 173] первоначально классифицировал эти синдромы в зависимости от места поражения (постсинаптические, синаптические или пресинаптические) и их патофизиологии. В настоящее время классификация уточнена благодаря проведению анализа мутаций, ответственных за развитие конкретного заболевания. Среди врожденных миастенических синдромов преобладают постсинаптические.

Как правило, симптомы миастенических синдромов проявляются уже в первые два года жизни. В редких случаях начало заболевания наступает во взрослом возрасте. Серьезность развития патологии сильно варьирует: от незначительных симптомов до прогрессирующей мышечной слабости и даже смерти. На сегодняшний день обнаружено порядка 60 мутаций в генах, кодирующих разные субъединицы мышечного nAChR ($\alpha 1$, $\beta 1$, ϵ и δ), которые приводят к развитию миастенического синдрома. Они затрагивают внеклеточный домен, трансмембранные домены M1 – M3 и цитоплазматическую петлю [174]. Помимо nAChR мутации также могут затрагивать гены рапсина и мышечной киназы MuSK и приводить к развитию заболевания в весьма серьезной форме [175, 176].

3.5 Нейрональные nAChR

nAChR широко распространены в периферической и центральной нервной системе (Рис. 3.8, 3.9) (ПНС и ЦНС, соответственно), а также в иммунной системе и различных периферических тканях организма [177-181]. В мозге млекопитающих представлены девять нейрональных субъединиц nAChR ($\alpha 2$ – $\alpha 7$ и $\beta 2$ – $\beta 4$), которые образуют разнообразные гомо- и гетеропентамерные рецепторы [182, 183]. В мозге преобладают $\alpha 7^*$ гомо- и гетеропентамерные рецепторы, а также ряд гетеромерных nAChR, в том числе $\alpha 4\beta 2^*$ и $\alpha 3\beta 4^*$ подтипы [184-189]. * означает, что в состав этих рецепторов могут входить дополнительные α или β субъединицы. Различная комбинация субъединиц nAChR определяет их важнейшие фармакологические характеристики: аффинность к лигандам, кинетику активации, десенситизации, проницаемость для определенных ионов и т.п. Например, большинство гетеромерных nAChR (композиции из $\alpha 2$ – $\alpha 6$ и $\beta 2$ – $\beta 4$ субъединиц) характеризуется высокой аффинностью (наномолярный диапазон концентраций) к агонистам, в то время как гомопентамерные рецепторы состава $\alpha 7$ – $\alpha 9$ обладают высоким сродством к антагонисту α -бунгаротоксину αBgt [190]. $\alpha 5$ и $\beta 3$ субъединицы не могут формировать рецепторов сами по себе, но могут быть включены в состав функциональных nAChR, поэтому их называют «вспомогательными»

субъединицами. Например, $\alpha 5$ -субъединица, включенная в состав $\alpha 6\beta 4\beta 3$ нАХР, обеспечивает высокую аффинность этого рецептора к никотину [191]. Рецептор же $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ характеризуется повышенной проницаемостью для ионов кальция и скоростью десенситизации, а также более высокой аффинностью к агонистам [192].

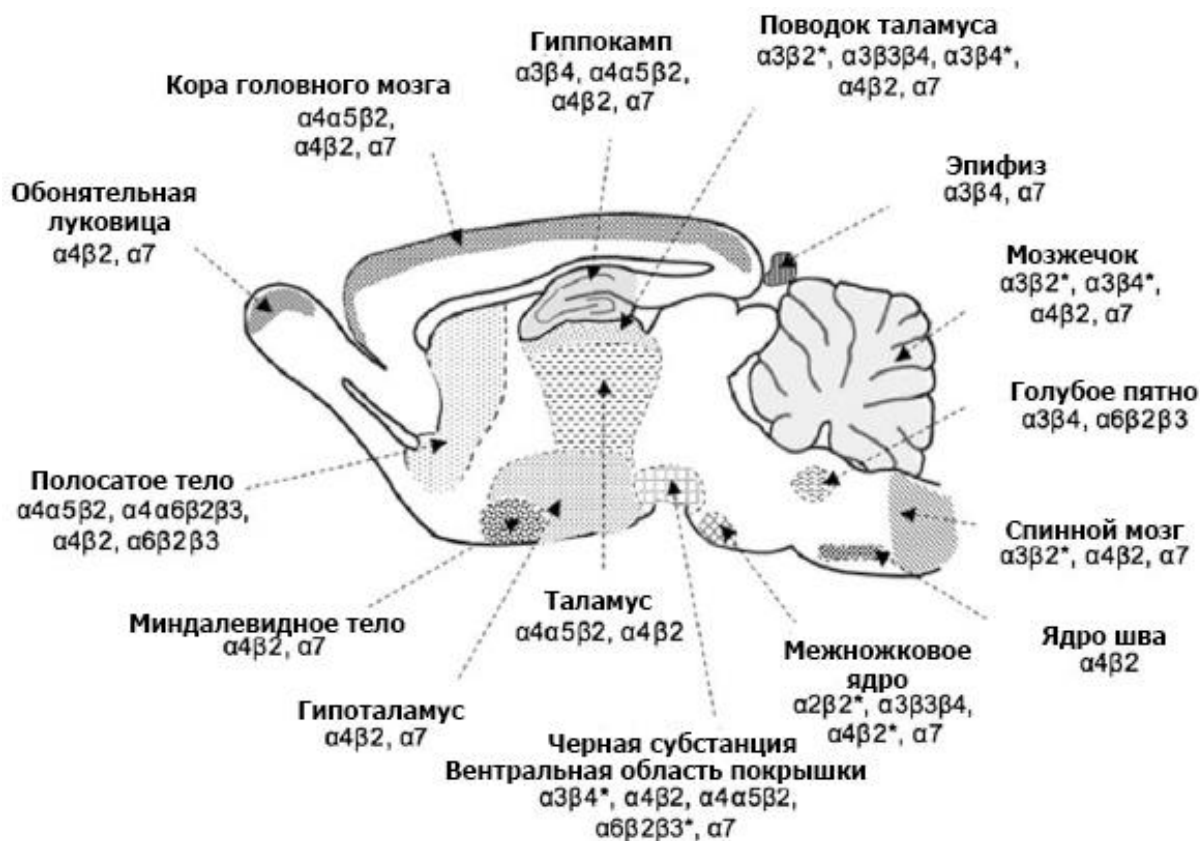


Рис. 3.8 – Распространение подтипов нАХР в различных участках мозга грызунов [19, 193].

Нейрональные нАХР в целом характеризуются высокой проницаемостью для ионов кальция [194, 195]; при их активации происходит заметное повышение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Приток Ca^{2+} вызывает деполяризацию мембраны с последующей активацией потенциал-зависимых кальциевых каналов [196, 197] или запускает высвобождение Ca^{2+} из рианодин-зависимых внутриклеточных депо, результатом чего становится весьма продолжительный кальциевый сигнал [197-200]. Выбор внутриклеточного сигнального пути зависит от субъединичного состава активируемого нАХР. Наиболее проницаемые для ионов кальция гомомерные $\alpha 7$ нАХР хотя и способны активировать потенциал-зависимые Ca^{2+} каналы [201], в основном провоцируют выход ионов кальция из внутриклеточных депо [197, 202, 203]. Активация

же гетеромерных $\alpha 3$ - и/или $\beta 2$ -содержащих nAХР, напротив, приводит к последующей сигнализации посредством открытия потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов [197, 199, 202, 203].

Первоначально было обнаружено, что $\alpha 4\beta 2^*$ подтип nAХР является основным в мозге, где он обеспечивает 90% высокоаффинных сайтов связывания никотина [187, 204], тогда как $\alpha 3\beta 4^*$ nAХР известен прежде всего как ганглионарный рецептор в ПНС. На сегодняшний день показано, что он также экспрессируется в различных областях мозга, например, в межножковом ядре среднего мозга (interpeduncular nucleus) и медиальной части поводка эпиталамуса (medial habenula) (Рис. 3.8) [187, 189]. Кроме того, субъединицы $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ и $\beta 3$ могут входить в состав различных nAХР, но эти рецепторы составляют меньшинство от всех nAХР в мозге (Рис. 3.8, 3.9).

Особое внимание исследователей приковано к $\alpha 7^*$ nAХР, т.к. эти рецепторы экспрессируются различными типами клеток как на периферии, включая иммунные клетки [203, 205-208] и нейроны [209], так и в областях мозга, которые ответственные за обучение и память [210] (Рис. 3.8, 3.9). Кроме того, эти рецепторы являются высокопроницаемыми для ионов кальция, что подразумевает их значительную роль в активации внутриклеточных процессов и высвобождении нейротрансмиттеров нейронами. В мозге $\alpha 7^*$ nAХР представлены как в нервных, так и в не-нейрональных клетках [206], таких как астроциты, микроглия, клетки-предшественники олигодендроцитов, эндотелиальные клетки и другие [203, 207, 208, 211-214]. Экспрессия $\alpha 7^*$ nAХР в этих не-нейрональных клетках предполагает их возможное участие в иммунных реакциях, воспалении и нейропротекторных процессах в мозге [215, 216]. Важной ролью $\alpha 7^*$ nAХР иммунных клеток является регуляция воспалительных процессов в организме за счет влияния на выработку воспалительных цитокинов и хемокинов [217, 218].

Первоначально считалось, что в организме $\alpha 7^*$ nAХР представлены исключительно гомопентамерными рецепторами, но позднее было показано, что он способен образовывать функциональный ионный канал в ассоциации с другими субъединицами, что объясняет расхождение в фармакологических данных для $\alpha 7^*$ nAХР, экспрессирующихся при сборке *in situ* и *in vitro* [219-222]. Сначала было обнаружено, что субъединицы $\alpha 7$ и $\beta 2$ способны к формированию совместных гетеропентамерных рецепторов *in vitro* [186, 188, 223]; впоследствии же было установлено, что холинергические нейроны переднего мозга производят функциональные nAХР состава $\alpha 7\beta 2$ с повышенной чувствительностью к амилоидному пептиду (A β) [224] (см. главу 3.5.1.1.1 Болезнь Альцгеймера).

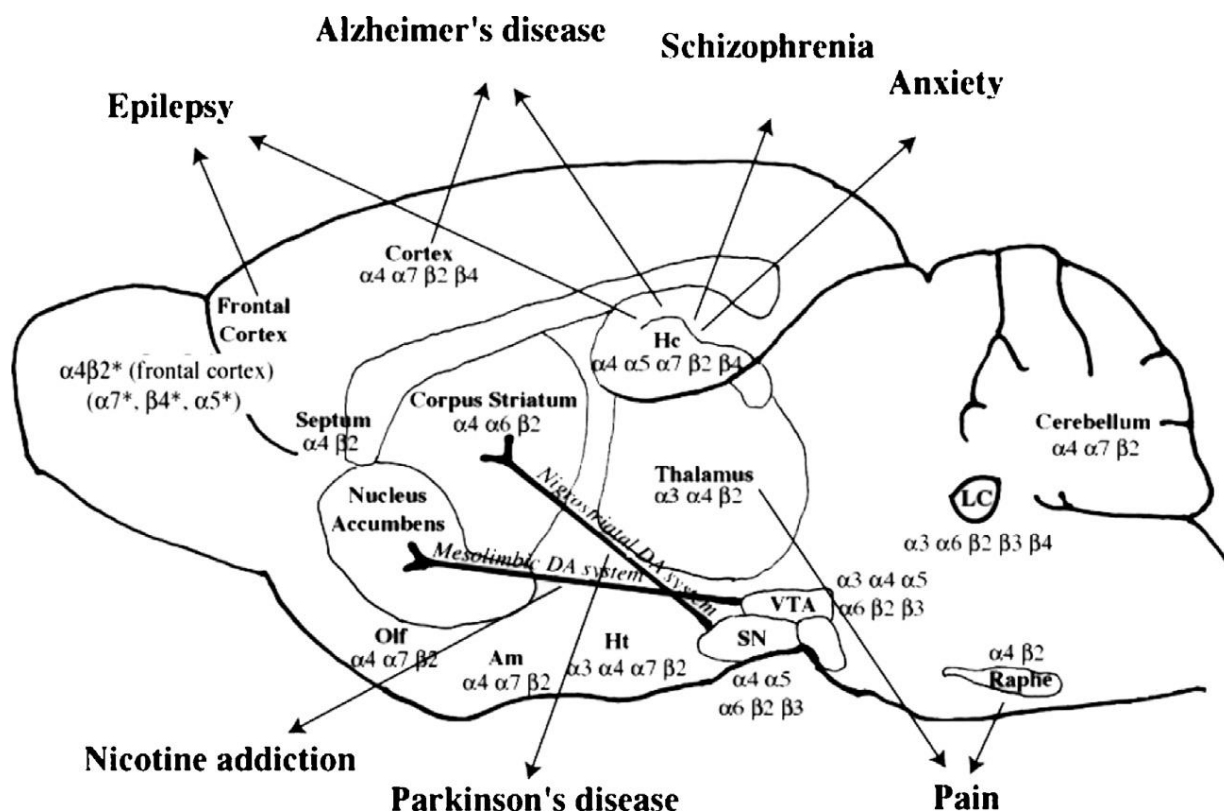


Рис. 3.9 – Связь распространенных в мозге нАХР с патологиями нервной системы [225].

В мозге нАХР располагаются как в синапсах (на пре- и постсинаптических мембранах), так и вне синапсов [19, 184, 185, 187, 226]. Электрофизиологические измерения обнаружили $\alpha 7^*$ нАХР-опосредованные синаптические ответы в интернейронах гиппокампа [227, 228], позднее оптогенетическая стимуляция холинергических волокон, иннервирующих гиппокамп, выявила ответы от интернейронов [229] и пирамидальных клеток [230], опосредованные активацией постсинаптически расположенных $\alpha 4\beta 2^*$ нАХР. Различные подтипы нАХР способны модулировать синаптическую передачу в других областях мозга, таких как зрительная область коры головного мозга, интернейроны коры, ядра таламуса и другие [231-234]. Помимо расположения пресинаптически и постсинаптически, когда нАХР усиливают выброс нейротрансмиттеров и возбудимость нейрона, они также находятся на нервных клетках вне области синапсов, где также участвуют в различных контактах с другими клетками [235, 236]. Большинство холинергических нервных окончаний в мозге не образуют истинных синапсов, однако способны высвобождать АХ, распространяющийся диффузно.

До настоящего времени не установлена точная роль экстрасинаптических нАХР при функционировании нейронных сетей и в механизмах нейропластичности мозга.

Сложность в выявлении точной роли нАХР при функционировании нейронных сетей и в механизмах нейропластичности мозга, а также при различных заболеваниях нервной системы во многом объясняется разнообразием как субъединичного состава нАХР, так и их локализации. Так, субъединичный состав задает ионную проницаемость и кинетические характеристики конкретного подтипа нАХР, а локализация определяет вклад конкретной популяции нАХР в активность нейронной сети. Преобладание тех или иных подтипов нАХР в различных отделах ЦНС и ПНС обуславливают их вовлеченность в ряд заболеваний (Рис. 3.9, Таблица 3.1). Как можно видеть, нАХР рассматриваются как терапевтические мишени при нейродегенеративных и психических заболеваниях, нарушениях развития нервной системы и хронической боли.

Таблица 3.1 – Вовлеченность нАХР в патологии нервной системы. Дана классификация патологий, описаны затронутые участки нервной системы, указаны важные субъединицы нАХР и потенциальные лекарственные средства (ЛС), идентифицированные в настоящее время при проведении доклинических и клинических исследований

Заболевание	Отдел нервной системы	Субъединицы нАХР	Потенциальные ЛС
Болезнь Альцгеймера	Холинергические ядра переднего мозга, гиппокамп, кора головного мозга	$\alpha 7$, $\alpha 4$, $\beta 2$	Агонисты, частичные агонисты и ПАМ $\alpha 7$ нАХР, агонисты $\alpha 4\beta 2$ нАХР
Аутизм, расстройство аутистического спектра	Кора головного мозга, гиппокамп, миндалина, базальные ганглии, мозжечок	$\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 2$	Агонисты, ПАМ $\alpha 4\beta 2$ нАХР
Шизофрения	Гиппокамп, кора головного мозга	$\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$	Агонисты, частичные агонисты и ПАМ $\alpha 7$ нАХР, частичные агонисты $\alpha 4\beta 2$ нАХР
Хроническая боль	Спинномозговые ганглии, ствол мозга, вентромедиальный продолговатый мозг, спинной рог спинного мозга	$\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 2$	Агонисты, ПАМ $\alpha 4\beta 2$ нАХР, ПАМ $\alpha 7$ нАХР, антагонисты $\alpha 9$

3.5.1 Связь нейрональных нАХР с заболеваниями

3.5.1.1 Нейродегенеративные заболевания

Дисфункция нейрональных нАХР отмечена при развитии различных нейродегенеративных заболеваний, в том числе болезней Альцгеймера и Паркинсона. В настоящем обзоре будет больше внимания уделено болезни Альцгеймера, т.к. механизмы

болезни Паркинсона и участие в них нАХР будут подробно рассмотрены в разделе 5.6.2 Ранние стадии болезни Паркинсона.

3.5.1.1.1 Болезнь Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера – нейродегенеративное заболевание, характеризующееся ухудшением памяти и когнитивных функций, которое является главной причиной деменции у людей в возрасте >60 лет. Большинство диагностированных случаев заболевания представлены спорадической или не наследуемой формой болезни Альцгеймера. Выявление же генетических причин, которые лежат в основе развития наследственной формы болезни Альцгеймера, позволило определить основную причину серьезных нарушений деятельности синапсов и нейронных сетей как патологическое накопление бета-амилоидных пептидов (Аβ) с неправильной конформацией. Следует отметить, что до настоящего времени нет единого четкого понимания биохимических причин развития болезни.

Бета-амилоидные пептиды образуются в результате протеолитического расщепления трансмембранного белка – предшественника бета-амилоида (amyloid precursor protein (APP)) Длина Аβ пептидов варьирует от 38 до 43 аминокислот в зависимости от активности гамма-секретазы, которая разрезает аминокислотную последовательность APP в трансмембранной части и формирует С-конец пептида. Наиболее хорошо изученным и патогенным считается Аβ42.

Наряду с накоплением Аβ пептидов неправильной структуры, а также нейрофибриллярных клубков тау-белка внутри нейронов наблюдается существенное ухудшение деятельности холинергической нервной системы в мозге пациентов с ранней деменцией вследствие развития болезни Альцгеймера [237]. Это происходит из-за гибели холинергических нейронов переднего мозга и снижения выработки АХ. Ингибиторы ацетилхолинэстеразы были первыми одобренными лекарственными средствами для улучшения когнитивных функций, затронутых при ранней стадии болезни Альцгеймера (потере памяти, путанице и проблемах с мышлением). До настоящего времени они остаются востребованными.

Области мозга, связанные с вниманием, пространственной и эпизодической памятью, утрачивают холинергическую иннервацию на ранних этапах развития болезни Альцгеймера; так, холинергическая дисфункция наиболее очевидна в новой коре и височных долях головного мозга, а также в гиппокампе [238]. Современная модель холинергического дефицита при болезни Альцгеймера утверждает, что бета-амилоидные

пептиды и тау-белок преимущественно накапливаются в области септо-гиппокампального пути, что приводит к потере холинергического фенотипа нервными волокнами и клетками (например, потере некоторых типичных нейрхимических маркеров, таких как холинацетилтрансфераза и т.п.) и в конечном итоге утрате холинергических нейронов базальных ядер переднего мозга посредством нарушений функционирования nAChR, а также выработки трофического нейронального фактора – фактора роста нервов (NGF) [239]. Хорошо изучена взаимосвязь между NGF-опосредованной сигнализацией и активацией $\alpha 7^*$ nAChR, которая также ответственна за развитие холинергического фенотипа нейрона [215]. Таким образом, наиболее вероятно, что именно нарушение функционирования $\alpha 7^*$ nAChR способствует развитию холинергического дефицита и когнитивных изменений при ранней стадии болезни Альцгеймера.

Различные подтипы nAChR в разной степени вовлечены в болезнь Альцгеймера. A β предпочтительно накапливается в областях мозга, обогащенных $\alpha 4\beta 2^*$ и $\alpha 7^*$ nAChR, что может являться ключевым условием для понимания наиболее сильной уязвимости новой коры и гиппокампа к токсическому действию A β , для которого известна высокая аффинность к этим подтипам nAChR [240, 241]. При этом $\alpha 7^*$ nAChR проявляет исключительное сродство к A β (пикомолярный диапазон концентрации) [242], предполагая их физиологическое взаимодействие в мозге, которое может влиять на синаптическую передачу и нейропластичность [243-245], а также участвовать в A β -опосредованной дисфункции нейронных сетей [244, 246]. Имеется довольно много противоречивых литературных данных о взаимодействии A β с $\alpha 4\beta 2^*$ и $\alpha 7^*$ nAChR. Анализируя имеющееся разнообразие и принимая во внимание многообразие стехиометрии nAChR и их расположения на нейронах, а также многочисленность областей мозга, подверженных заболеванию, складывается ощущение, что A β активирует или ингибирует $\alpha 4\beta 2^*$, $\alpha 7^*$ nAChR в зависимости от их микроокружения, а также концентрации, длины и конформации бета-амилоидного пептида [224, 247-253]. Учитывая, что *in vivo* популяция бета-амилоидных пептидов весьма гетерогенна, а их концентрация увеличивается по мере развития заболевания, вполне вероятно, их взаимодействия с nAChR будут весьма динамичны, что стоит принимать во внимание при разработке терапевтических подходов.

По мере прогрессирования болезни Альцгеймера уровень мускариновых nAChR остается практически неизменным [254, 255], в то же время происходит потеря до 50% $\alpha 4\beta 2^*$ nAChR в новой коре головного мозга и гиппокампе, уровень же экспрессии $\alpha 7^*$ nAChR гораздо более стабилен, хотя имеются различные литературные данные [256, 257].

При умеренных когнитивных нарушениях, которые вероятно разовьются в болезнь Альцгеймера [258], видна обратная динамика: активность холинацетилтрансферазы и уровень экспрессии $\alpha 7^*$ нАХР повышены в гиппокампе и лобной доле новой коры головного мозга [259-261]. Зафиксированные уровни экспрессии $\alpha 7^*$ нАХР находились в обратной корреляции со степенью тяжести заболевания согласно проведенным нейропсихологическим тестам, которые направлены на диагностику болезни Альцгеймера [261]. В этом случае можно предполагать, что усиленная экспрессия $\alpha 7^*$ нАХР является отражением так называемого когнитивного резерва (термин, который обозначает очень хорошую память у людей на ранней стадии болезни Альцгеймера, для диагностики которой разработаны биомаркеры [262, 263]).

За несколькими исключениями [264], А β ингибирует $\alpha 4\beta 2^*$ нАХР [224], уровень экспрессии которых сильно снижается при ранних стадиях болезни Альцгеймера, в то время как взаимодействие бета-амилоидного пептида с $\alpha 7^*$ нАХР может приводить к временной активации рецептора [265, 266] и внутриклеточных сигнальных каскадов способствующих выживанию и лучшему функционированию нейронов [267]. Тем не менее, с увеличением концентрации А β происходит десенситизация большинства рецепторов и подавление их функциональной активности, вероятно, сопровождающееся повышенной экспрессией $\alpha 7^*$ нАХР для временной компенсации рецепторных потерь [215, 240, 268]. Эта модель хорошо отражает данные о повышенном уровне экспрессии $\alpha 7^*$ нАХР астроцитами и нейронами в мозге пациентов с болезнью Альцгеймера [269-272], а также у животных при моделировании болезни Альцгеймера [273] и в нейрональных клеточных культурах, подверженных воздействию А β на протяжении длительного времени [274]. Кроме того, большинство $\alpha 7^*$ нАХР в мозге людей с болезнью Альцгеймера связано с А β [270, 275], при диссоциации которого может восстанавливаться функция рецептора. Это наблюдение имеет терапевтическое значение, но стоит учитывать результаты исследования *in vitro*, которое показало, что повышенная возбудимость нейронов может быть нежелательным побочным следствием вмешательств во взаимодействие А β с $\alpha 7^*$ нАХР [274].

Ингибиторы ацетилхолинэстеразы, разработанные для компенсации наблюдающегося холинергического дефицита на начальных стадиях болезни Альцгеймера, применяют и на более поздних стадиях развития заболевания для улучшения памяти и других когнитивных функций. Изученная фармакологическая активность этих препаратов предполагает наличие эффектов, дополняющих простое увеличение уровня АХ; например, было показано, что галантамин также является

положительным аллостерическим модулятором $\alpha 7^*$ и $\alpha 4\beta 2^*$ нАХР [104, 276] и наряду с донепезилом увеличивает уровень экспрессии нАХР в гиппокампе и новой коре головного мозга крыс [277].

Из вышеприведенных данных очевиден терапевтический потенциал лигандов $\alpha 7^*$ и $\alpha 4\beta 2^*$ нАХР, однако большинство клинических испытаний подобных соединений для лечения болезни Альцгеймера не дали ожидаемых результатов и многие фармацевтические компании в настоящее время приостановили подобные испытания (см. обзор [278]). Из проведенных исследований стало очевидно, что во многом «провал» клинических испытаний обусловлен набором пациентов на поздних стадиях развития болезни Альцгеймера и общим выводом стало, что наилучшей стратегией будет лечение пациентов на ранних стадиях заболевания, для которых испытываемые средства оказались гораздо более эффективными. К тому же эти исследования подтолкнули к пересмотру причин сильных наблюдаемых различий между результатами доклинических исследований, полученными для животных, и данными клинических испытаний. Так, очевидно, что некоторые расхождения связаны с: а) различиями между модельными и реальными условиями в организме пациента, б) некорректно выбранным диапазоном концентраций для тестирования, в) необходимостью показать, что эффективность данного соединения превосходит уже существующие подходы и т. п. Вероятно, многие многообещающие кандидаты в лекарственные препараты были преждевременно отклонены не из-за своей истинной неэффективности, а из-за ряда сопутствующих обстоятельств. Ожидается, что внушительный прогресс, достигнутый за последние три десятилетия в понимании структуры и функционирования нАХР как уникальных лиганд-управляемых ионных каналов, а также их вклада в передачу нервных сигналов и сопутствующую обработку информации, откроет новые возможности для разработки лекарственных средств.

3.5.1.2 Шизофрения

Шизофрения — психическое расстройство, характеризующееся распадом процессов мышления и эмоциональных реакций. Наиболее частыми проявлениями болезни являются слуховые галлюцинации, параноидный или фантастический бред либо дезорганизованность речи и мышления на фоне значительной социальной дисфункции и нарушения работоспособности. Часть причин возникновения шизофрении кроется в генетических нарушениях. В частности, дисфункцию нАХР в гиппокампе связывают с

шизофренией [279]. Среди пациентов, страдающих шизофренией, высок процент курящих людей, что считается формой самолечения, т.к. может приводить к частичной нормализации когнитивных и сенсорных функций организма [280] [281]. Воздействие никотина (либо посредством курения, никотин-содержащей жевательной резинки, назального спрея или пластыря) способно улучшать или нормализовать наблюдаемый сенсорный дефицит при шизофрении [281]. Возможно, замена никотина, обладающего рядом неблагоприятных воздействий на здоровье, другими более безопасными лигандами nAChR может оказаться полезным для облегчения ряда симптомов, связанных с шизофренией. Так, при клинических испытаниях варениклина, частичного агониста nAChR, показано, что он улучшает ряд когнитивных способностей у больных шизофренией [282-284]. Однако достоверно установить, какой подтип nAChR играет решающую роль в эффектах варениклина не удалось, т.к. он является частичным агонистом $\alpha 4\beta 2$ nAChR и полным агонистом $\alpha 7$ nAChR [285].

Хорошо изучено, что в мозге больных шизофренией уменьшен уровень экспрессии $\alpha 7^*$ nAChR (особенно в гиппокампе) [279]. Прямая генетическая связь была установлена еще в 1997 году, когда у больных шизофренией был обнаружен полиморфизм на участке хромосомы 15q13–14, где расположен ген $\alpha 7$ субъединицы. В модельных экспериментах на животных была показана эффективность таких ПАМ (II типа) $\alpha 7$ nAChR как PNU-120596 и JNJ-1930942 для улучшения функций слухового аппарата, которые снижены при шизофрении [286-288]. Более того, несколько клинических испытаний поддерживают использование агонистов $\alpha 7$ nAChR для лечения когнитивных нарушений при шизофрении. Например, частичные агонисты $\alpha 7$ nAChR (GTS 21 [289], DMXB-A [290] или EVP-6124 [291]) исправляли когнитивный и/или сенсорный дефицит при шизофрении.

В настоящее время агонисты и ПАМ $\alpha 7^*$ nAChR являются весьма перспективными кандидатами в лекарственные средства при шизофрении. В настоящий момент необходимо определить механизм синаптической недостаточности при шизофрении и клеточные механизмы, ответственные за наблюдаемые положительные эффекты этих селективных $\alpha 7^*$ nAChR лигандов. Эта информация обеспечит дальнейший толчок в развитии терапевтических методов лечения когнитивных нарушений, связанных с шизофренией.

3.5.1.3 Аутизм

Аутизм — расстройство, возникающее вследствие нарушения развития головного мозга и характеризующееся выраженным и всесторонним дефицитом социального

взаимодействия и общения, а также ограниченными интересами и повторяющимися действиями [292, 293]. nAХР экспрессируются как дифференцированными, так и недифференцированными клетками ЦНС и от их правильного функционирования напрямую зависит процесс нейрогенеза при развитии мозга [294, 295]. Имеющиеся данные свидетельствуют о весомой роли нарушений функционирования холинергической системы при аутизме [296]. В исследовании, проведенном на мозге взрослых аутистических пациентов после смерти, с использованием разных подходов было зафиксировано значимое 40 – 50% снижение экспрессии $\alpha 3$, $\alpha 4$ и $\beta 2$ субъединиц nAХР в коре головного мозга, при этом уровень $\alpha 7$ субъединицы оставался неизменным [297]. Сниженная экспрессия генов $\alpha 4$ и $\beta 2$ субъединиц nAХР в коре головного мозга является основной нейрохимической патологией при аутизме [297]. Таким образом, холинергическая нервная передача ухудшается у больных аутизмом и терапия может быть направлена на восстановление ее функционирования [298, 299]. Поэтому агонисты и позитивные аллостерические модуляторы (ПАМ) $\alpha 4\beta 2^*$ nAХР рассматриваются как потенциальные лекарственные средства при данном расстройстве.

Недавно было обнаружено, что ингибиторы ацетилхолинэстеразы (AChE), например, донепезил и галантамин, повышающие концентрацию ацетилхолина в синапсе [300], вызывают выраженное улучшение в отношении проблематичного для аутизма поведения: устного общения, контакта глаз и эмоциональной отзывчивости [301]. Также клинические испытания показали, что галантамин безопасен и относительно эффективен в облегчении некоторых симптомов, связанных с аутизмом, например, раздражительности и вялости, социальной отстраненности [302]. Таким образом, проведенные исследования говорят о возможности применения агонистов и позитивных аллостерических модуляторов (ПАМ) nAХР для облегчения симптомов при аутизме. Дальнейшие исследования необходимы для изучения и разработки подобных лекарственных средств, на данный момент для этих целей можно рекомендовать использование ингибиторов AChE, одобренных для клинического применения.

3.5.1.4 Хроническая боль

Боль — неприятное сенсорное и эмоциональное переживание, связанное с истинным или потенциальным повреждением ткани или описываемое в терминах такого повреждения. На основании источника происхождения боли выделяют ее три основных типа: ноцицептивная, нейропатическая и психогенная [303]. При ноцицептивной боли

происходит активация рецепторов периферической нервной системы болевыми стимулами. Нейропатическая боль развивается вследствие повреждений или патологий нервной системы [304]. При психогенной боли нельзя выделить некие соматические повреждения в организме, ответственные за появление интенсивной боли. Если боль сохраняется в течение более нескольких месяцев, то она классифицируется как хроническая [305]. Давно известно, что нАХР участвуют в передаче болевых ощущений, поэтому проводится довольно много исследований обезболивающей активности их агонистов и ПАМ [306]. Так, микроинъекция никотина в разные области ствола мозга вызывала обезболивающий эффект [307]. У крыс обезболивающий эффект, вызываемый никотином подавлялся введением антагониста нейрональных нАХР мекамиламина [308]. Алкалоид эпibatидин, неселективный агонист нАХР, также обладает широким спектром антиболевой активности [309, 310]. При дальнейших исследованиях был обнаружен ряд нежелательных побочных эффектов эпibatидина, таких как дозозависимое снижение двигательной активности у животных, а также снижение температуры тела [309]. Наблюдаемые побочные эффекты эпibatидина [311] во многом объясняются разнообразием активируемых подтипов нАХР [312], что ограничивает его использование в качестве лекарственного средства.

После этих данных стали проводиться исследования более селективных лигандов нАХР как обезболивающих средств в надежде избежать большинства побочных эффектов. Первыми были изучены лиганды $\alpha 4\beta 2$ нАХР. Так, сильный анальгетический эффект был продемонстрирован для структурного аналога эпibatидина АВТ-594, который является селективным высокоаффинным агонистом $\alpha 4\beta 2$ нАХР [313]. В различных животных моделях боли обезболивающий эффект АВТ-594 был заингибирован введением неселективного антагониста нАХР мекамиламина [311]. Однако терапевтическое окно АВТ-594 было очень узким, т.к. он был эффективен только при применении довольно высоких доз препарата, введение которых сопровождалось серьезными побочными эффектами, такими как тошнота, головокружение и рвота [314]. Впоследствии для других разработанных селективных агонистов $\alpha 4\beta 2$ нАХР (ТС-2696 и ТС-6499) аналогично сообщалось об узком терапевтическом окне при эффективном обезболивании нейропатических болей [315]. Также для А-366833, высокоаффинного агониста $\alpha 4\beta 2$ нАХР, было продемонстрировано значительное обезболивающее действие в различных моделях нейропатической боли [316]. Полагают, что активация пресинаптических $\alpha 4\beta 2$ нАХР в спинном мозге, которые модулируют ГАМК- и глицинергические нейроны, может приводить к ингибированию ноцицептивных сигналов [306, 315, 317, 318]. Вероятно, для

эффективной анальгезии активации исключительно $\alpha 4\beta 2$ нАХР будет недостаточно и более выраженный обезболивающий эффект будет наблюдаться при одновременной стимуляции и $\alpha 3$ -содержащих нАХР [183, 315].

Для выяснения точной роли $\alpha 7$ нАХР в анальгезии требуется проведение дополнительных исследований, т.к. имеющиеся в данный момент данные часто противоречивы. Если селективный агонист $\alpha 7$ нАХР холин, продукт ферментативного расщепления АХ, оказывал обезболивающий эффект в моделях боли у животных [319], то другие агонисты, SSR-180711 и тропизетрон, не показали эффективности в формалиновом тесте [315].

Проводился ряд доклинических испытаний обезболивающего действия позитивных аллостерических модуляторов $\alpha 4\beta 2$ и $\alpha 7$ нАХР [299, 320]. Так, PNU-120596 (ПАМ $\alpha 7$ нАХР) снижал интенсивность механической гипералгезии (аномально высокая чувствительность организма к механическим болевым стимулам) у крыс [321]. Кроме того, PNU-120596 был способен уменьшать формалин-индуцированную боль сам по себе, а также в сочетании с агонистами $\alpha 7$ нАХР – холином, никотином и РНА-543613 [322]. Этот модулятор также уменьшал отек задней лапы у мышей при инъекции каррагинана [323]. PNU-120596 наряду с другим ПАМ $\alpha 7$ нАХР, NS-1738, снижали выраженность гипералгезии от тепловых раздражителей [323]. Интересно, что при моделировании хронической нейропатической боли введение PNU-120596, но не NS-1738, вызывало снижение интенсивности гипералгезии и аллодинии – видов аномально высокой болевой чувствительности на стимуляцию, обычно вызывающую боль не такой интенсивности (гипералгезия) или не провоцирующую болевых ощущений в норме (аллодиния) [323]. Вероятным механизмом для наблюдаемых эффектов инъекции PNU-120596 является существенное увеличение числа активированных $\alpha 7$ нАХР, а также амплитуды и длительности ионных токов для каждого канала, что может косвенно стимулировать ингибиторные интернейроны, вовлеченные в нейронные цепи передачи сигналов нейропатической боли.

Позитивный аллостерический модулятор $\alpha 4\beta 2$ нАХР NS-9283 сам по себе не влияет на механическую аллодинию, ноцицепцию или воспаление в различных моделях боли у грызунов, в том числе нейропатической боли [324]. Однако при его совместном введении с агонистами $\alpha 4\beta 2$ нАХР АВТ-594 [324] и NS-3965 [325] он усиливал их благоприятные эффекты в отношении выраженности аллодинии и ноцицепции, соответственно. Следовательно, объединение ПАМ и агонистов $\alpha 4\beta 2$ нАХР может служить многообещающей стратегией при разработке терапевтических средств для лечения острой

и хронической боли, которые будут лишены большинства нежелательных побочных эффектов агонистов $\alpha 4\beta 2$ nAHP, вызванных узким терапевтическим окном их действия.

Среди других подтипов nAHP, которые могут рассматриваться как терапевтические мишени для обезболивающих агентов, стоит упомянуть те, которые включают $\alpha 5$ субъединицу (может входить в состав $\alpha 4\beta 2^*$, $\alpha 3\beta 2^*$ и $\alpha 3\beta 4$) [326], а также $\alpha 9\alpha 10$ nAHP [327]. Так, обезболивающий эффект никотина был снижен у мышей, нокаутных по гену $\alpha 5$ субъединицы nAHP, свидетельствуя о ее возможной роли в процессах ноцицепции [326]. Известно, что мРНК $\alpha 9$ и $\alpha 10$ субъединиц nAHP обнаружены в ноцицептивных нейронах спинномозговых ганглиев, которые передают болевые сигналы с периферии в спинной мозг [327]. α -Конотоксины, специфические ингибиторы $\alpha 9\alpha 10$ nAHP, проходят доклинические и клинические испытания как обезболивающие средства [328].

Имеющиеся фармакологические данные свидетельствуют о важной роли nAHP в процессах ноцицепции и обработки ноцицептивной информации. Но, учитывая многообразие подтипов nAHP, экспрессируемых в ЦНС и ПНС, а также сложность и пластичность нейронных сетей, ответственных за эти процессы, разработка терапевтических средств для лечения острых и хронических болей на основе холинергических лигандов представляет весьма сложную задачу.

3.6 nAHP «не-нейронального» происхождения

Ацетилхолин является не только одним из основных нейромедиаторов в организме человека и животных, но и вырабатывается многими другими клетками помимо нейронов. Уже в 1929 году АХ был найден в селезенке лошадей и волов [329]. С тех пор было обнаружено, что АХ вырабатывается самыми разнообразными клетками: иммунными клетками [330], клетками поджелудочной железы [331], кератиноцитами [332], клетками эпителия кишечника [333] и др. Кроме широкого распространения ацетилхолина, стоит отметить обширное многообразие подтипов как гомо-, так и гетеропентамерных nAHP, которые обнаружены в ряде клеток организма: в иммунных клетках (лимфоцитах, нейтрофилах и др.), кератиноцитах, хромоаффинных клетках надпочечников, клетках микроглии, астроцитах и др. [334-336] Например, было показано, что выработка АХ лимфоцитами связана с активностью холинацетилтрансферазы (ChAT) и способна регулировать иммунные и воспалительные реакции организма [337, 338]. Последующие исследования показали, что решающую роль в уменьшении степени воспаления на уровне нейроиммунной сигнализации в организме играет так называемый «холинергический противовоспалительный рефлекс» [339, 340]. Большинство исследований роли так

называемых не-нейрональных нАХР в организме связаны с изучением тех или иных аспектов данного рефлекса.

3.6.1 Холинергический противовоспалительный рефлекс

В модели эндотоксемии у крыс было продемонстрировано, что электростимуляция блуждающего нерва значительно ослабляет высвобождение провоспалительных цитокинов и предотвращает развитие шока [339, 340]. Это наблюдение позволило определить «холинергический противовоспалительный рефлекс» как взаимодействие нервной и иммунной систем. Удаление селезенки предотвращало вышеупомянутый подавляющий эффект активации блуждающего нерва, что продемонстрировало ключевую роль этого органа для проявления данного рефлекса [341]. Кроме того, интактность адренергических селезеночных нервов [342] важна для физиологически нормального проявления холинергического противовоспалительного рефлекса при эндотоксемии [343]. Морфометрический анализ показал, что адренергический нерв заканчивается в белой пульпе селезенки, области скопления Т-лимфоцитов, что предполагает непосредственную связь адренергических нервных волокон с Т-лимфоцитами, вырабатывающими АХ. Стимуляция блуждающего нерва или добавление норадреналина значительно усиливает высвобождение АХ лимфоцитами селезенки, что в свою очередь приводит к снижению выработки провоспалительных цитокинов макрофагами за счет активации $\alpha 7$ нАХР на их поверхности [342]. Иммунологические эффекты от выработки ацетилхолина ненейрональными клетками весьма разнообразны и зависят как непосредственно от источника АХ, так и от репертуара нАХР на поверхности клеток-мишеней. Так, АХ, вырабатываемый В-лимфоцитами может модулировать иммунную активность нейтрофилов при воспалении [344].

В настоящее время понятие «холинергического противовоспалительного рефлекса» получило более широкое трактование и не ограничивается только классических путем при стимуляции блуждающего нерва. Так, учитывая разнообразие источников нейронального и ненейронального АХ и широко распространенное нАХР, считается, что аналогичный механизм ответственен за противовоспалительные эффекты АХ не только в кишечнике, но также в ЦНС и других органах [345]. Так, при стимуляции блуждающего нерва происходит активация холинергических нейронов Ауэрбахова сплетения в кишечнике и выделяется АХ, оказывающий противовоспалительный эффект за счет непосредственного взаимодействия с резидентными макрофагами [345-347]. В ЦНС АХ активирует $\alpha 7$ нАХР, располагающиеся на клетках микроглии и астроцитах, что приводит к снижению степени

нейровоспаления [348, 349]. Как в центральной нервной системе, так и на периферии $\alpha 7$ нАХР считается ключевым акцептором АХ, за счет активации которого происходит запуск противовоспалительных механизмов.

3.6.1.1 Роль $\alpha 7$ нАХР моноцитов/макрофагов

Помимо уже описанного противовоспалительного эффекта взаимодействия $\alpha 7$ нАХР макрофагов с АХ, вырабатываемым Т-лимфоцитами [342] и нейронами Ауэрбахова сплетения [350], показана важная роль этих рецепторов наряду с $\alpha 9$ нАХР в предпочтительном развитии противовоспалительных моноцитов. Так, в работе St-Pierre et al. было продемонстрировано, что воздействие никотина снижает соотношение провоспалительных и противовоспалительных моноцитов, представленных в популяции, выделенной из костного мозга [351]. Механизм основан на снижении пролиферации и жизнеспособности клеток путем связывания никотина с $\alpha 7$ и $\alpha 9$ нАХР. В этой же работе было показано, что никотин снижает выработку провоспалительных цитокинов и увеличивает продукцию противовоспалительных, в этом процессе основную роль играет $\alpha 7$ нАХР [351]. Также было обнаружено, что взаимодействуя с $\alpha 7$ и $\alpha 9$ нАХР, никотин подавляет инфильтрацию $CCR2^+$ Ly6C^{high} провоспалительных моноцитов и нейтрофилов в ЦНС в мышинной модели рассеянного склероза [352]. В более раннем исследовании было обнаружено, что $\alpha 7$ и $\alpha 9$ нАХР могут принимать участие в регулировании развития клеток иммунной системы [353]. Исходя из результатов ряда исследований, был сделан вывод о том, что $\alpha 7$ и $\alpha 9$ рецепторы являются основными подтипами нАХР, которые регулируют число провоспалительных моноцитов. Это заключение было подтверждено экспериментами с использованием мышей, нокаутных по генам $\alpha 7$ и $\alpha 9$ субъединиц нАХР, соответственно [351, 352].

3.6.1.2 Роль $\alpha 7$ нАХР микроглии и астроцитов

Принимая во внимание, что клетки микроглии и астроциты активно участвуют в нейровоспалительных каскадах [354, 355] и несут на своей поверхности $\alpha 7$ нАХР [18, 208], многие исследования посвящены роли холинергического противовоспалительного рефлекса в ЦНС. Имеющиеся данные свидетельствуют о нейропротекторных эффектах при активации этого рефлекса за счет подавления воспалительных реакций в ЦНС [356]. Так, в мышинной модели инсульта введение агониста $\alpha 7$ нАХР (PNU282987) снижало степень нейровоспаления, воздействуя на рецепторы микроглиальных клеток, и

приводило к уменьшению выраженности ишемического инфаркта мозга и улучшению моторных навыков у животных [348]. Инкубация с никотином заметно уменьшала высвобождение фактора некроза опухолей из культуры микроглиальных клеток, вызванное добавлением липополисахарида [208]. При моделировании болезни Паркинсона у мышей введение никотина уменьшало число гибнущих дофаминергических нейронов за счет подавления активности астроцитов [357]. Никотин также снижал выброс провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-6, фактор некроза опухолей и интерлейкин-1 β , из культивируемых эмбриональных астроцитов человека, активированных рекомбинантным интерлейкином-1 β [349]. В настоящее время активация холинергического противовоспалительного рефлекса через воздействие на $\alpha 7$ nAChR рассматривается как перспективное направление терапии для ограничения чрезмерного воспаления в ЦНС.

3.6.1.3 Сигнальные каскады, запускаемые активацией $\alpha 7$ nAChR

В работах Wang et al. было установлено, что активация $\alpha 7$ nAChR на макрофагах приводит к снижению выброса ими провоспалительных цитокинов за счет игибирования сигнального каскада с участием ядерного фактора κB (NF- κB) [358]. Последующее исследование также показало, что при воздействии никотина уровень высвобождения фактора некроза опухолей макрофагами снижается за счет активации сигнального пути $\alpha 7$ nAChR/MyD88/NF- κB [359]. Однако активация $\alpha 7$ nAChR никотином также сопровождается фосфорилированием киназы JAK2, причем иммунопреципитация показала непосредственное взаимодействие этих двух белков [360]. Для проявления противовоспалительного эффекта никотина также необходимо фосфорилирование киназой JAK2 фактора транскрипции STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), который уже непосредственно связывается с определенными участками ДНК в ядре и предотвращает выработку провоспалительных цитокинов [361]. Таким образом, на молекулярном уровне в холинергическом противовоспалительном рефлексе задействованы оба описанных сигнальных каскада, что было подтверждено в экспериментах с мышами, нокаутными по соответствующим генам [358] [205, 361].

3.7 Лиганды nAChR

Первая ступень классификации лигандов nAChR включает их подразделение на агонисты, антагонисты или модуляторы с последующей более детальной классификацией

внутри каждой группы. Агонисты далее классифицируют как полные или частичные в зависимости от их относительной эффективности по сравнению с ацетилхолином (или другим эталонным агонистом). Иногда также можно встретить наименование супер- или гипер-агонист, если эффективность лиганда существенно превышает таковую АХ. Антагонисты подразделяют на конкурентные или неконкурентные на основании их способности связываться (т.е. конкурировать) в том же участке связывания, что и агонисты, называемом ортостерическим лиганд-связывающим сайтом. Как следствие, существенный избыток агониста может предотвратить связывание конкурентного антагониста с рецептором, однако этот метод не применим в случае неконкурентного антагонизма.

Модуляторы нАХР могут напрямую взаимодействовать с рецептором или оказывать влияние на его активность, связываясь с другими белками, вовлеченными в метаболизм агонистов. Например, ингибиторы ацетилхолинэстеразы являются косвенными модуляторами активности нАХР, хотя некоторые из них могут и напрямую взаимодействовать с рецепторами. Модуляторы прямого действия являются аллостерическими, т.к. они изменяют вероятность перехода рецептора в то или иное конформационное состояние (см. раздел 3.3 Функционирование нАХР).

Для любого из лигандов вопрос селективности к определенному подтипу нАХР или какой группе рецепторов чаще всего является ключевым, если речь идет об его потенциальной применимости в качестве инструмента исследований или лекарственного препарата. Кроме того, для терапевтически нацеленных лигандов критичной является их способность проникать через гематоэнцефалический барьер и достигать нАХР в ЦНС, что в зависимости от задач терапии может быть как их желательным действием, так и приводить к ряду побочных эффектов. Например, гексаметоний и мекамилламин оба являются относительно неселективными антагонистами нейрональных нАХР и оба обладают некоторой активностью в качестве гипотензивного средства из-за их способности блокировать синаптическую передачу вегетативной нервной системы. В отличие от гексаметония мекамилламин способен проникать в ЦНС, что побудило исследователей проверить его лекарственную эффективность при синдроме Туретта, курении и депрессии. Напротив, для лечения мышечной слабости при миастении среди ингибиторов ацетилхолинэстеразы предпочтительным является неостигмин, который не проникает в ЦНС и тем самым избавлен от широкого спектра холинергических побочных эффектов.

Классификация лигандов осложнена тем, что большинство из них являются неселективными и даже могут обладать противоположной активностью по отношению к тому или иному подтипу nAChR. Так, лиганд, избирательно активирующий один подтип рецептора, может связываться с другими nAChR и действовать в этом случае как конкурентный антагонист [362] или десенситизирующий агент [363]. Кроме того, существует сложный спектр эффектов, которые можно наблюдать при взаимодействии между полными и частичными агонистами. Так, в зависимости от выбранной концентрации и режима дозирования частичный агонист может усиливать или подавлять действие полного агониста, а также может активировать nAChR при отсутствии полного агониста [135]. Именно частичные агонисты nAChR являются терапевтически перспективными или уже применяются при таких патологических состояниях как болезнь Альцгеймера [364], депрессия [365], шизофрения [366] и курение [367]. Их отличает сильная вариабельность собственной активности, а также способность модулировать эндогенную холинергическую активность и эффекты никотина и других веществ, действующих на nAChR.

3.7.1 Агонисты nAChR

Агонисты nAChR структурно разнообразны и включают как вещества из природных источников растительного и животного происхождения, так и разнообразные синтетические молекулы [183, 368]. В настоящем обзоре будут представлены некоторые примеры полных и частичных агонистов nAChR, многие из которых применялись при выполнении настоящего исследования (см. рис. 3.10, 3.11).

Для классических агонистов nAChR относительная эффективность действия может быть представлена в виде следующей последовательности: Эпibatидин > Никотин = Цитизин \geq АХ > Карбамоилхолин (Карбахол).

3.7.1.1 Полные агонисты nAChR

Эпibatидин

Эпibatидин (Рис. 3.10) был выделен из кожного экстракта эквадорской ядовитой лягушки из семейства древолазов (*Epipredobates tricolor*) [369]. Это бициклический алкалоид (содержащий азабициклопептановую структуру, связанную с хлорпиридильным фрагментом) является одним из самых эффективных неселективных агонистов nAChR,

причем оба его энантиомера демонстрируют сходную активность. Константы связывания эпibatидина с гетеромерными nAХР располагаются в субнанолярном диапазоне концентраций [370]. Его же функциональная активность в отношении гетеромерных nAХР и $\alpha 8$ nAХР также весьма высока и оценивается как субмикромольные значения EC50, тогда как для активации $\alpha 7$ и мышечного nAХР требуются микромольные концентрации эпibatидина [312, 368]. *In vivo* эпibatидин является эффективным обезболивающим агентом [369], но характеризуется узким терапевтическим окном из-за ряда побочных эффектов как следствия его неселективности. Мишенями обезболивающего действия эпibatидина являются nAХР, располагающиеся как в спинном, так и в головном мозге [371-373]. Соответствующие эффективные дозы были рассчитаны как 0,25 – 10 мкг/кг [373] или 0,1 – 1,0 мкг [372] (интратекально крысам), 1– 10 мкг/кг при подкожном введении [371, 374].

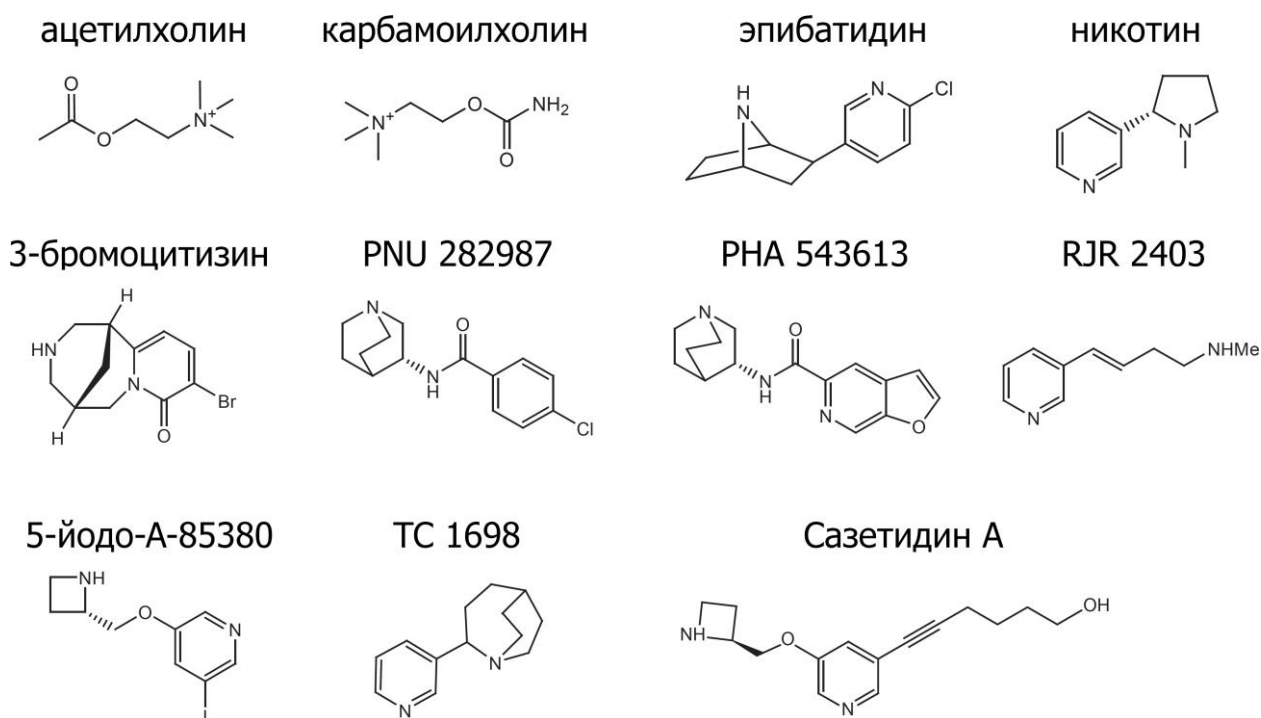


Рис. 3.10 – Химические структуры полных агонистов nAХР.

Никотин

Никотин (Рис. 3.10) является алкалоидом пиридинового ряда, он содержится в растениях семейства пасленовых, преимущественно в листьях и стеблях табака. Он активирует все подтипы nAХР за исключением $\alpha 9$ и $\alpha 9\alpha 10$ nAХР, для которых является конкурентным антагонистом [375]. Исторически чувствительность к никотину легла в

основу классификации никотиновых ацетилхолиновых рецепторов. Наибольшим сродством никотин обладает к $\alpha 4\beta 2$ nAХР ($K_i \sim 1$ нМ) [376], его же микромолярные концентрации активируют большинство нейрональных nAХР [183]. Никотин легко проникает через гематоэнцефалический барьер, его фармакокинетика и метаболизм в организме детально исследованы [377], на основании чего рекомендованы дозы для *in vivo* исследований [378]. Для никотина характерна колоколообразная форма кривой дозозависимости при проведении физиологических экспериментов, так, при подкожном введении крысам наиболее эффективными являются дозы менее 0,4 мг/кг.

Основным метаболитом никотина является котинин, который является слабым агонистом некоторых подтипов nAХР [379]. *In vivo* его длительный период выведения из организма способствует переходу большого пула nAХР в десенситизированное состояние, что характерно как для курильщиков, так для экспериментальных животных [377, 380].

Ацетилхолин

Ацетилхолин (Рис. 3.10) – эндогенный полный агонист всех подтипов nAХР. Очень популярен для проведения электрофизиологических и им подобных экспериментов, обычно применяется в достаточно высокой концентрации (порядка 100 мкМ). Минусами его применения является дополнительная активация мускариновых АХР и его подверженность гидролизу. Для получения корректных результатов исследователям часто необходимо совместно с АХ применять антагонист мускариновых АХР (обычно атропин, ~ 1 мкМ) и ингибитор ацетилхолинэстеразы, однако не стоит забывать о возможном прямом взаимодействии обоих этих агентов с nAХР. Холин, продукт расщепления АХ, является селективным полным агонистом $\alpha 7$ nAХР ($EC_{50} = 1,6$ мМ). [381, 382]. Он также обладает слабой частичной агонистической активностью в отношении $\alpha 3\beta 4^*$ nAХР [382] и ингибирует некоторые подтипы nAХР [383].

Карбамоилхолин

Карбамоилхолин (Рис. 3.10) является карбаматным аналогом АХ, который сохраняет способность активировать мускариновые АХР, но устойчив к гидролизу. Часто применяется как неселективный агонист мускариновых АХР и в исследованиях мышечных nAХР [384], к $\alpha 4\beta 2$ и $\alpha 7$ nAХР обладает более низким сродством [385]. N-метилирование карбамоилхолина (получение N-метилкарбамоилхолина) восстанавливает высокую (нанолярную) аффинность связывания с $\alpha 4\beta 2$ nAХР [385]. N-метилирование

также обеспечивает существенную селективность связывания N-метилкарбамоилхолина с никотиновыми, но не мускариновыми АХР.

3-Бромоцитизин

3-Бромоцитизин (Рис. 3.10) является самым эффективным из серии производных цитизина, галогенированных в разных положениях пиридинового кольца [386, 387]. Это производное обладает сходным фармакологическим профилем, что и исходная молекула цитизина, но является на порядок более высокоаффинным агонистом nАХР. 3-Бромоцитизин обладает пикомолярным сродством к $\alpha 4\beta 2$ nАХР ($K_i \sim 80$ пМ); кривая дозозависимости активации этих рецепторов 3-бромоцитизином является двухфазной, что отражает экспрессию $\alpha 4\beta 2$ nАХР разной стехиометрии в ооцитах *Xenopus* ($EC_{50} = 5$ пМ и 9 нМ) [388]. Эффективен *in vivo* в дозе 0,1 – 0,2 мг/кг у крыс [389].

PNU 282987

PNU 282987 (Рис. 3.10) является высокоаффинным и селективным агонистом $\alpha 7$ nАХР ($K_i = 27$ нМ; $EC_{50} = 150$ нМ), со слабой активностью в отношении 5-НТЗ рецепторов ($K_i = 0,9$ мкМ) [390]. Этот агонист широко используется для целенаправленной активации именно $\alpha 7$ nАХР. *In vivo* эффективен в дозах 1 – 30 мг/кг при внутрибрюшинном введении [391], 1 мг/кг при введении внутривенно и 10 – 40 нМ при локальном введении в мозг [392].

PNA 543613

PNA 543613 (Рис. 3.10) является новым $\alpha 7$ -селективным агонистом ($K_i = 8,8$ нМ; $EC_{50} = 65$ нМ) с незначительным сродством к другим nАХР и слабой активностью в отношении 5-НТЗ рецепторов ($K_i = 500$ нМ) [393]. При проведении физиологических исследований PNA 543613 в дозах 0,3 – 1,0 мг/кг быстро проникал через гематоэнцефалический барьер и был эффективен в ряде поведенческих тестов у крыс [393], а также *in vivo* вызывал нейрохимические изменения у мышей в тех же дозах.

RJR 2403

RJR 2403 (Рис. 3.10) (также известен как транс-метаникотин или ТС-2403) был впервые синтезирован как разомкнутый аналог никотина, этот алкалоид также встречается в природе как минорный компонент в растениях табака. Имеет предпочтительное сродство к $\alpha 4\beta 2$ nАХР ($K_i = 26$ нМ; $EC_{50} = 730$ нМ) по сравнению с другими подтипами

нАХР [394, 395]. В опытах *in vivo* RJR 2403 демонстрирует схожий с никотином профиль активности, хотя и не повторяет всех его эффектов благодаря более высокой селективности действия [396]. Он также оказывал обезболивающее действие у мышей в дозах 10 – 30 мг/кг [397] или 10 – 200 мг/кг [398], однако в тех же исследованиях никотин оказался заметно эффективнее.

5-йодо-А-85380

Йодированный аналог А-85380 (Рис. 3.10) демонстрирует предпочтительную селективность к $\beta 2$ -содержащим нАХР по сравнению с другими подтипами, являясь их высокоаффинным агонистом ($EC_{50} = 13$ нМ) [399]. Это его свойство оказывается весьма полезным для активации $\beta 2$ -, но не $\beta 4$ -содержащих нАХР [400]. Эффективность 5-йодо-А-85380 *in vivo* была показана в ряде исследований. Например, он улучшал слуховое восприятие у мышей при внутривентральном введении в дозах 0,1 – 1 мг/кг [401]. При введении в состав 5-йодо-А-85380 короткоживущего радиоизотопа ^{123}I он используется для визуализации $\alpha 4\beta 2$ нАХР в мозге людей с помощью однофотонной эмиссионной компьютерной томографии [402].

ТС 1698

ТС 1698 (Рис. 3.10) является полным агонистом $\alpha 7$ нАХР ($EC_{50} = 440$ нМ), частичным агонистом мышечного нАХР ($EC_{50} = 20$ мкМ) и конкурентным антагонистом $\alpha 4\beta 2$ нАХР ($IC_{50} = 0,3$ мкМ при действии 30 мкМ АХ) [403]. ТС 1698 (10 мкМ) вызывает изменения показателей жизнеспособности клеток *in vitro*, действуя через активацию JAK2 сигнального пути.

Сазетидин А

Первоначально было показано, что сазетидин А (Рис. 3.10), аналог А-85380 с ацетиленовой группой в 5 позиции, является высокоэффективным десенситизирующим агентом для $\alpha 4\beta 2$ нАХР [404]. Последующие исследования показали, что он является агонистом для этого подтипа нАХР, но степень активации зависит от стехиометрии рецептора. Так, рецепторы со стехиометрией $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ нАХР практически к нему не чувствительны, тогда как нАХР состава $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ демонстрируют полный функциональный ответ на добавление сазетидина А ($EC_{50} = 6$ нМ) [363]. Этот агент также успешно активирует $\alpha 4\alpha 6\beta 2\beta 3$ нАХР ($EC_{50} = 19 - 44$ нМ), однако значительно менее эффективен в отношении $\alpha 6\beta 2\beta 3$ нАХР ($EC_{50} = 0,15$ мкМ) [405]. Сазетидин А проявляет

гораздо более слабое сродство к $\alpha 3\beta 4$ и $\alpha 7$ nAХР. Введение сазетидина А (3 мг/кг подкожно) уменьшало показатели самостоятельного патологического поглощения этанола и никотина при моделировании соответствующей зависимости у крыс. Также при внутривенной инъекции сазетидина А (0,01 – 0,1 мг/кг) или местной инфузии в гиппокамп (10 пМ – 1 нМ) у крыс сглаживались симптомы, вызванные прекращением поглощения никотина [406]. Благодаря этим исследованиям сазетидин А является перспективным соединением для борьбы с алкогольной и никотиновой зависимостями.

3.7.1.2 Частичные агонисты nAХР

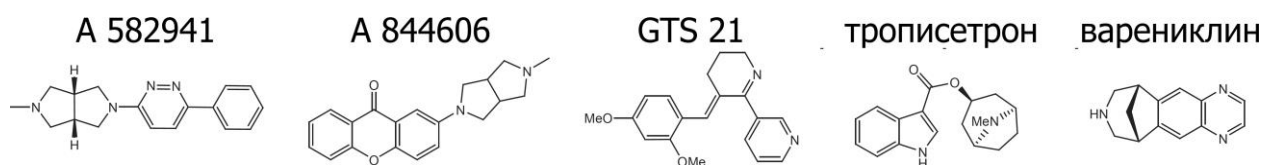


Рис. 3.11 – Химические структуры частичных агонистов nAХР.

A 582941

A 582941 (Рис. 3.11) демонстрирует высокую аффинность и селективность к $\alpha 7$ nAХР ($K_i = 10$ нМ) [407], однако является лишь его частичным агонистом с 60% эффективностью ($EC_{50} = 2,4$ мкМ). Не проявляет заметной активности в отношении других протестированных подтипов nAХР. A 582941 был эффективен в ряде поведенческих тестов в дозах 0,01 – 1 мкмоль/кг при внутривенном способе введения у грызунов или при внутримышечном введении у обезьян [407], а также в дозах 1 – 10 мг/кг у крыс [408] и 0,04 – 4 мг/кг у мышей [409].

A 844606

A 844606 (Рис. 3.11) является селективным частичным агонистом $\alpha 7$ nAХР, который связывается с этим подтипом рецепторов с высоким сродством ($IC_{50} = 11$ нМ) и эффективно их активирует в ооцитах *Xenopus* ($EC_{50} \sim 2$ мкМ) [410]. Он разработан на основе структуры хорошо известного синтетического индуктора интерферона тилорона, который сам по себе проявляет высокое сродство к $\alpha 7$ nAХР [411]. Его аналог с включением ^{11}C исследуется как потенциальный лиганд для позитронно-эмиссионной томографии.

GTS 21

GTS 21 (Рис. 3.11, также известен как DMXB) первоначально был определен как лиганд nAХР, улучшающий когнитивные способности [412]. В последующих исследованиях было выяснено, что он является частичным агонистом $\alpha 7$ nAХР и слабым антагонистом $\alpha 4\beta 2$ и других гетеромерных nAХР [413]. Кристаллизация комплекса АХСБ с GTS 21 показала, что рецепторная петля С занимает промежуточное положение, т.е. не полностью приближена к ортостерическому лиганд-связывающему сайту, что характерно для связывания классических полных агонистов. Такие конформационные изменения могут объяснять смешанный профиль активности GTS 21 в отношении nAХР [83]. Также была отмечена видоспецифичность действия GTS 21. Так, для $\alpha 7$ nAХР крысы была определена EC_{50} (GTS 21) как 5 мкМ при 32% эффективности активации рецептора. Для $\alpha 7$ рецептора человека эти показатели составляли 11 мкМ и 9%, соответственно [414]. Исследования фармакокинетики этого соединения показали, что GTS 21 быстро проникает через гематоэнцефалический барьер и время его полувыведения из плазмы крови составляет около двух часов [415]. GTS 21 (0,1 – 10 мг/кг внутривенно) улучшает показатели сенсорного восприятия и когнитивных способностей в модельных экспериментах у грызунов [413], а также улучшает внимание и память у пациентов с шизофренией. Профиль активности метаболитов GTS 21 сходен с таковым для исходного соединения [416]

Варениклин

Варениклин (Рис. 3.11, препараты Chantix (США); Champix (ЕС)) был получен путем целенаправленного изменения структуры цитизина для получения средства против курения [417]. Варениклин – частичный агонист $\alpha 4\beta 2$ nAХР ($EC_{50} \sim 2$ мкМ; эффективность 13% относительно АХ) [418], $\alpha 6\beta 2\beta 3^*$ nAХР ($EC_{50} = 0,1 - 0,2$ мкМ; эффективность 6 – 27%) [419] и $\alpha 3\beta 4$ nAХР ($EC_{50} \sim 50$ мкМ; эффективность 75%). Для $\alpha 7$ nAХР этот агент является полным эффективным агонистом ($EC_{50} = 0,8 - 18$ мкМ в зависимости от происхождения рецептора) [418]. Варениклин снижает потребления алкоголя, действуя через $\alpha 4^*$ nAХР, что было продемонстрировано в экспериментах с генетически модифицированными мышами [420]. Варениклин эффективен *in vivo* в дозах 0,01 – 6,0 мг/кг при введении подкожно или перорально [421] и его период полувыведения составляет 4 и 17 часов у крысы и человека, соответственно.

Трописетрон

Трописетрон (Рис. 3.11), известный антагонист 5-HT₃ рецепторов [422], также является частичным агонистом $\alpha 7$ nAХР ($EC_{50} = 1$ мкМ) [423]. Он также эффективно ингибирует $\alpha 9\alpha 10$ nAХР ($IC_{50} = 70$ нМ) [424] и в более высоких концентрациях – $\alpha 3\beta 4$ nAХР [423]. Трописетрон (1 – 3 мг/кг) также может активировать $\alpha 7$ nAХР *in vivo*, что было показано при блокировании его физиологических эффектов у животных с помощью метиликаконитина, специфического антагониста $\alpha 7$ рецепторов [425].

3.7.2 Антагонисты nAХР

3.7.2.1 Конкурентные антагонисты nAХР

3.7.2.1.1 α -Нейротоксины змей

На данный момент насчитывается более пятисот α -нейротоксинов с установленными аминокислотными последовательностями, выделенных из различных ядов змей. Их число постоянно увеличивается благодаря успехам геномики и транскриптомики. В настоящее время выделяют два основных структурных типа α -нейротоксинов: короткие (60–62 аминокислотных остатка, четыре дисульфидные связи, Рис. 3.12А) и длинные (66–75 аминокислотных остатков, пять дисульфидных связей, Рис. 3.12Б). Если для α -нейротоксинов длинного типа характерна дополнительная пятая дисульфидная связь в их центральной петле II (Рис. 3.12Б), то нейротоксины «необычного типа» (non-conventional neurotoxins) несут аналогичную связь в N-концевой петле I (Рис. 3.12В). Трехпетельная пространственная организация коротких α -нейротоксинов довольно распространена среди других белков из ядов змей, которые не взаимодействуют с nAХР [426-428], а также характерна для цитотоксинов. Последние не имеют определенной белковой мишени в организме, они неспецифически разрушают клеточные мембраны [429].

Как правило, α -нейротоксины с короткой цепью (например, эрабутоксин) блокируют только nAХР мышечного типа, а длинноцепочечные α -нейротоксины (например, α -бунгаротоксин и α -кобротоксин) обладают сравнимой активностью в отношении как мышечного, так и нейрональных $\alpha 7$ и $\alpha 9/\alpha 10$ nAХР. Однако существуют исключения из этого общего правила: например, короткий α -нейротоксин из яда мексиканской коралловой змеи ингибирует как мышечные, так и $\alpha 7$ nAХР с сопоставимой активностью [430], также как и хадитоксин, димерный короткоцепочечный α -нейротоксин из яда королевской кобры *Ophiophagus hannah* [431].

Более подробно с характеристиками нейротоксинов можно ознакомиться в ряде обзоров литературы [432-434]. В настоящей работе активно применялись длинноцепочечные α -нейротоксины с похожими фармакологическими характеристиками: α -бунгаротоксин из яда южнокитайского многополосого крайта *Bungarus multicinctus* и α -кобротоксин из яда моноклевого кобры *Naja kaouthia*. Оба токсина с высоким сродством (K_i 10^{-8} – 10^{-9} М) взаимодействуют с нАХР мышечного типа, а также с $\alpha 7$ – $\alpha 9^*$ нейрональными нАХР. Характеристики α -бунгаротоксина будут рассмотрены подробнее далее, они в большинстве случаев также справедливы и для α -кобротоксина.

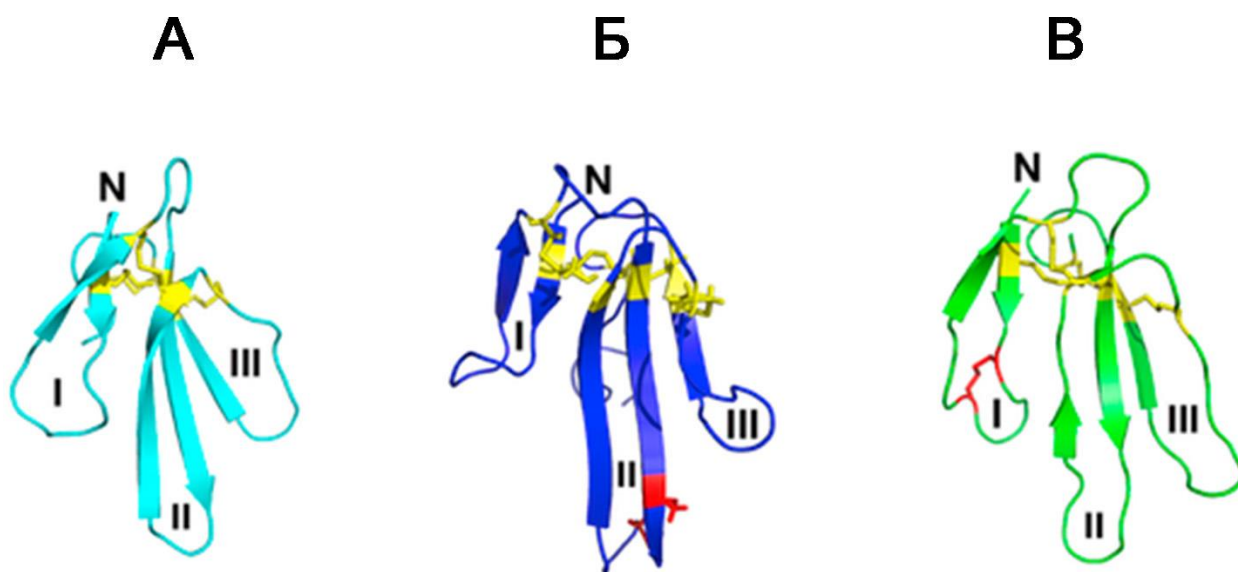


Рис. 3.12 – Пространственная структура трехпетельных α -нейротоксинов из яда змей, антагонистов нАХР. (А) эрабутоксин – α -нейротоксин короткого типа (5EBX); (Б) α -бунгаротоксин – α -нейротоксин длинного типа (1KFH); (В) кандоксин – α -нейротоксин «необычного типа» (non-conventional neurotoxin) (1JGK).

α -Бунгаротоксин (α Bgt)

Высокоаффинный псевдо-необратимый антагонист $\alpha 1\beta 1\gamma/\epsilon\delta$, $\alpha 7$ – $\alpha 9^*$ и некоторых нАХР беспозвоночных ($K_i \sim 1$ нМ) [375, 435, 436]. α Bgt имеет типичную трехпетельную структуру α -нейротоксина и размер порядка 8 кДа (Рис. 3.12Б). По данным кристаллографии с модельными объектами (АХСБ и др.), ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и модельных исследований при связывании α Bgt с ортостерическим лиганд-связывающим участком нАХР петля С оказывается в открытой конформации, т.е. отодвинута от оси рецептора. При этом по всей видимости основными являются π -катионные взаимодействия α -нейротоксина с Туг 190 петли С нАХР мышечного типа [50] и с аналогичным Туг 184 $\alpha 7$ нАХР [437].

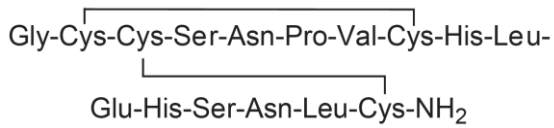
Высокая аффинность связывания α Bgt является следствием его очень медленной кинетики ассоциации и диссоциации, что активно используется на практике. Так, стандартная предварительная инкубация препарата с низкой наномолярной концентрацией (10 нМ) токсина в течение одного часа обеспечивает полное ингибирование целевых nAHR. Увеличение используемой концентрации в 10 или 100 раз позволяет снижать требуемое время преинкубации. Эта стратегия активно применяется благодаря высокой избирательности действия α Bgt. Кинетика очень медленной диссоциации α Bgt из комплекса с рецептором приводит к практически необратимой блокаде nAHR. Благодаря крупному размеру, α Bgt не проникает через гематоэнцефалический барьер, но может быть доставлен к мишеням в мозге при введении в желудочки мозга (эффективен при дозе 1,25 нМ) [438].

3.7.2.1.2 α -Конотоксины

α -Конотоксины являются высокоаффинными конкурентными пептидными антагонистами nAHR из яда морских моллюсков рода *Conus* [433, 439]. Яд этих моллюсков содержит коктейль токсинов, позволяющий им обездвиживать и убивать их добычу и хищников. Длина α -конотоксинов составляет 12 – 19 аминокислотных остатков, среди которых обязательно имеются консервативные остатки цистеина (не менее 4-х), образующие внутримолекулярные дисульфидные связи по определенному образцу. Спектр подтипов nAHR, которые чувствительны к α -конотоксинам, весьма широк (включая как мышечные, так и нейрональные nAHR подтипов $\alpha 3^*$, $\alpha 7^*$, $\alpha 9^*$ и др.), но зачастую они с одинаковой эффективностью взаимодействуют с рядом мишеней, что исследователи стараются преодолеть путем введения направленных изменений в их аминокислотные последовательности [440, 441]. Благодаря большому природному разнообразию α -конотоксинов и их многочисленным высокоспецифичным синтетическим аналогам, они являются востребованными молекулярными инструментами для фундаментальных исследований структуры и функции nAHR, а также перспективными кандидатами в лекарственные средства [328].

Подробно α -конотоксины, действующие на nAHR, рассмотрены в ряде обзоров ([433, 440]). В настоящей работе наиболее востребованным оказался α -конотоксин МП, на примере которого будут проиллюстрированы характеристики взаимодействия α -конотоксинов с nAHR.

α -Конотоксин МП



Первоначально было обнаружено, что α -конотоксин МП моллюска *Conus magus* селективно ингибирует $\alpha 3\beta 2$ нАХР ($IC_{50} = 0,5$ нМ) [442]. Позднее выяснили, что он является столь же высокоэффективным антагонистом $\alpha 6^*$ нАХР [443] ($IC_{50} = 0,4$ нМ). α -конотоксин МП широко используется *in vitro* для исследования роли $\alpha 6\beta 2^*$ нАХР в модулировании высвобождения дофамина нейронами нигростриатной системы в норме и при моделировании болезни Паркинсона (используемые концентрации составляли 10 – 100 нМ) [444, 445]. Введение α -конотоксина МП (0,02 – 2 нМ) интратекально оказывает обезболивающий эффект при моделировании невропатической боли [446]. Также для оказания действия на нАХР в мозге α -конотоксин МП вводился местно путем инъекции (0,25 – 25 пМ) [447], методом обратного диализа (1 – 10 мкМ) [448], а также в желудочки мозга (30 нМ) [449].

3.7.2.1.3 Низкомолекулярные конкурентные антагонисты нАХР

Дигидро- β -эритроидин

Дигидро- β -эритроидин (Рис. 3.13) – алкалоид, происходящий из семян эритрины (лат. *Erythrina*), является конкурентным антагонистом нейрональных нАХР, связывающимся в ортостерическом лиганд-связывающем сайте, что продемонстрировала кристаллическая структура его комплекса с АХСБ [450]. Субмикромольные концентрации дигидро- β -эритроидина блокируют рекомбинантные $\alpha 4\beta 2$ нАХР, но он примерно в 10 – 50 раз менее активен в отношении других подтипов нАХР, включая $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 6\beta 2^*$, $\alpha 7$ и $\alpha 9$ рецепторы [451-453]. Аналогичная разница в аффинности показана на примере нативных $\beta 2^*$ и $\beta 4^*$ нАХР [387]. Дигидро- β -эритроидин обычно используется в концентрации 1 – 10 мкМ для селективного ингибирования $\beta 2^*$ нАХР *in vitro* [375]. Он также эффективен *in vivo*, стандартно вводится в концентрации 2 – 4 мг/кг подкожно крысам [454] и мышам [455]. Более широкий диапазон доз позволяет решать специфические задачи, например, дозы до 10 мг/кг использовали для ингибирования эффектов никотина у крыс [456]. Наоборот, низкая доза 1 мг/кг позволила изучить роль $\beta 2^*$ нАХР в двигательных функциях организма у мышей с заменой Leu⁹Ala в субъединице $\alpha 4$, придающей ей гиперчувствительность [453].

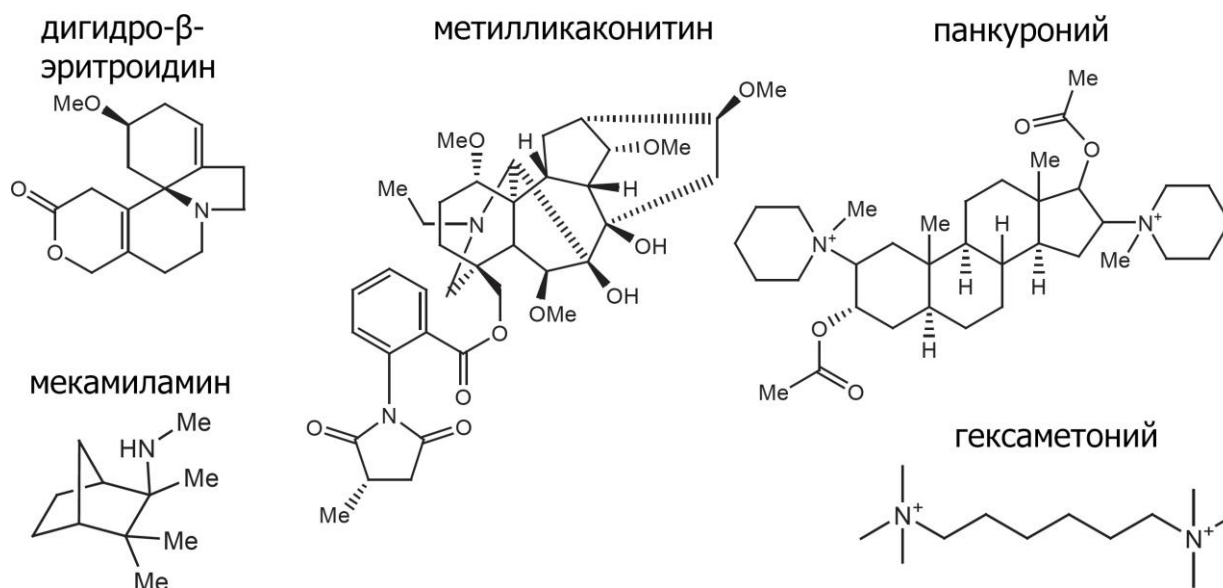


Рис. 3.13 – Химические структуры низкомолекулярных конкурентных и неконкурентных антагонистов nAХР.

Метилликаконитин

Метилликаконитин (Рис. 3.13) – алкалоид растений рода *Delphinium*, является селективным высокоаффинным ($K_i \sim 1$ нМ) конкурентным антагонистом $\alpha 7$ nAХР [457]. Кинетика ингибирования рецептора с помощью метилликаконитина быстрая и обратимая, что делает его широко используемым агентом, альтернативным α Vgt. Подобно α Vgt, метилликаконитин проявляет высокое (наномолярное) сродство к $\alpha 9$ и $\alpha 9\alpha 10$ nAХР, а также nAХР беспозвоночных [436] и АХСБ [40]. Кристаллизация комплекса АХСБ с метилликаконитином, показывает, что он связывается в ортостерическом сайте, при этом петля С остается отодвинутой от лиганд-связывающего сайта АХСБ [40]. В отличие от α Vgt метилликаконитин гораздо менее аффинен к мышечному nAХР, чем к $\alpha 7$ рецептору [458]. Он также является слабым антагонистом $\alpha 4\beta 2$ nAХР ($IC_{50} \sim 0,2$ мкМ) и, что интересно, может связываться неконкурентно в неканоническом $\alpha 4 - \alpha 4$ сайте связывания $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ nAХР [457]. Метилликаконитин довольно высокоаффинный антагонист $\alpha 6\beta 2^*$ nAХР ($K_i \sim 30$ нМ) [452], что может быть проблематичным для исследований *in vivo*, когда местная концентрация метилликаконитина не известна, особенно в областях, обогащенных катехоламинергическими клетками с высоким уровнем экспрессии $\alpha 6^*$ nAХР. Метилликаконитин легко проникает через гематоэнцефалический барьер при подкожном введении в дозах 4 – 10 мг/кг грызунам [455], но замечено, что хроническое поглощение никотина снижает степень его проникновения в мозг [459].

***d*-Тубокурарин**

Классический неселективный антагонист нАХР, подробно рассмотрен в главе 5.7.3. Алкалоиды из яда кураре племени Matis.

Панкуроний

Панкуроний (Рис. 3.13) – известный стероидный недеполяризующий миорелаксант, блокирующий нервно-мышечную передачу посредством ингибирования мышечных нАХР на постсинаптической мембране [460]. Применяется клинически для обратимой нервно-мышечной блокады при проведении различного рода операций под анестезией. Панкуроний приблизительно на порядок более эффективный ингибитор мышечного нАХР, чем *d*-тубокурарин [461]. Наномолярные концентрации панкурония успешно ингибируют как незрелую форму мышечного нАХР ($(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$), так и его взрослый вариант ($(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$) [462]. В отличие от *d*-тубокурарина, панкуроний предпочтительнее связывается с лиганд-связывающим сайтом в области контакта α - и δ -субъединиц по сравнению с α/ϵ сайтом [463]. Он заметно хуже ингибирует нейрональные нАХР, связываясь с ними при добавлении микромолярных концентраций антагониста [464].

3.7.2.2 Неконкурентные антагонисты нАХР

Гексаметоний

Изначально было обнаружено, что гексаметоний (Рис. 3.13) эффективно блокирует нАХР вегетативных ганглиев, в результате чего его использовали для лечения гипертонии и ряда других патологий [465]. Он является потенциал-чувствительным блокатором открытого канала нАХР [466]. Гексаметоний ингибирует как мышечные, так и разнообразные нейрональные нАХР со значением $IC_{50} \sim 10\text{--}20$ мкМ [418, 467]. Гидрофильная природа этого соединения ограничивает его способность пересекать гематоэнцефалический барьер. В связи с этим он часто используется в сравнительных исследованиях *in vivo* с антагонистом центрального действия (обычно мекамиламином), чтобы установить, опосредованы ли наблюдаемые эффекты центральным или периферическим действием блокаторов нАХР [468]. Стандартно используемые дозы для системного введения – 2 – 10 мг/кг [469, 470]. При непосредственном введении в мозг, гексаметоний эффективно ингибирует нАХР центральной нервной системы [470].

Мекамиламин

Мекамиламин (Рис. 3.13) был также разработан как ганглионарный блокатор для лечения гипертонии [471]. В отличие от гексаметония, мекамиламин легко проникает через гематоэнцефалический барьер и рассматривается как потенциальный лекарственный агент при лечении нервно-психических расстройств [472]. Молекулярно-динамические исследования показывают, что мекамиламин находится преимущественно в протонированной форме, за счет чего легко проникает в вестибюль открытого канала, блокируя его [473]. Мекамиламин успешно ингибирует большинство нейрональных nAHP ($IC_{50} \sim 0,1-5$ мкМ), будучи несколько более высокоаффинным в отношении $\alpha\beta\gamma$ nAHP [418, 451]. Для достижения полного ингибирования большинства нейрональных nAHP *in vitro* достаточной является концентрация мекамиламина равная 10 мкМ, однако его связывание с $\alpha\gamma$ nAHP является легко обратимым [474], поэтому требуется повышение действующей концентрации в большинстве практических исследований. При концентрации 1 – 10 мкМ мекамиламин неконкурентно блокирует мышечный nAHP, а при более высоких концентрациях (100 мкМ) способен временно ингибировать NMDA-рецепторы [474]. Благодаря своей способности легко пересекать гематоэнцефалический барьер, мекамиламин часто выбирается для проведения физиологических экспериментов. Он эффективен уже в дозах 1 – 3 мг/кг для блокирования nAHP в ЦНС грызунов *in vivo*, хотя используют дозы до 10 мг/кг [475].

3.7.3 Позитивные аллостерические модуляторы (ПАМ) nAHP

Позитивные аллостерические модуляторы (ПАМ) [476] взаимодействуют с отличными от ортостерического лиганд-связывающими сайтами nAHP (см. главу 3.2.5.3 Аллостерические участки связывания лигандов) и изменяют вероятность нахождения рецептора в состоянии покоя, открытой или десенситизированной конформации, изменяя соответствующие энергетические барьеры перехода между этими состояниями (Рис. 3.6). Они либо понижают энергетический барьер для перехода из состояния покоя в активированное состояние, либо повышают барьер перехода из этого состояния в десенситизированное. В результате увеличивается вероятность активации рецептора агонистами и, следовательно, усиление их действия [183], хотя сами по себе ПАМ не проявляют агонистической активности [477]. В эту группу входят структурно разнообразные вещества от низкомолекулярных до белковых агентов. ПАМ весьма привлекательны терапевтически, поскольку они усиливают действие эндогенного агониста ацетилхолина в отношении nAHP, при этом не изменяя существенно

холинергическую иннервацию. В связи с этим активно проводится поиск новых ПАМ, селективных к определенным подтипам нАХР, как с помощью стандартных подходов направленного синтеза, так и с использованием новых *in silico* методик [478].

Наиболее многочисленными и востребованными оказались ПАМ $\alpha 7$ нАХР, среди которых выделяют два типа соединений – ПАМ I и II типа [476, 477]. ПАМ I типа снижают энергетический барьер перехода между состоянием покоя и активированным состоянием рецептора, повышая эффективность действия агонистов без изменения кинетических параметров ионных токов. Например, NS 1738 является широко используемым ПАМ I типа [110]. ПАМ II типа, напротив, повышают энергетический барьер перехода рецептора в десенситизированное состояние, таким образом, усиливая как амплитуду, так и продолжительность действия агониста. PNU 120596 был первым обнаруженным соединением этого типа [183]. Применение ПАМ II типа существенно расширяет спектр методов для исследования функционирования $\alpha 7$ нАХР, которые характеризуются чрезвычайно труднодетектируемыми кратковременными ионными токами низкой амплитуды [479].

Далее рассмотрены несколько примеров ПАМ, применяемых в исследованиях нАХР.

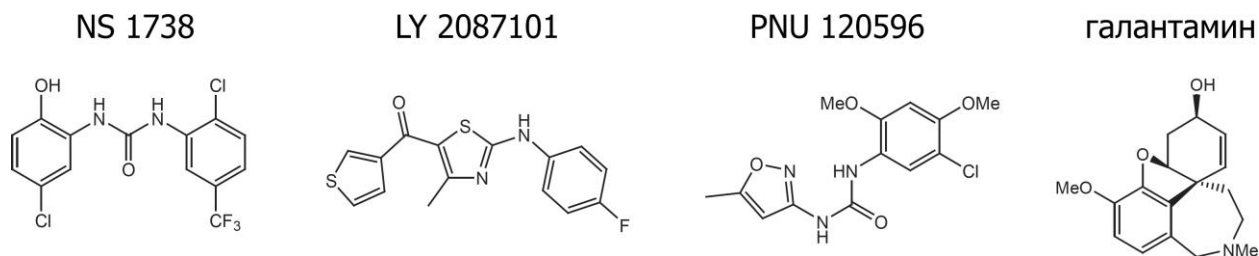


Рис. 3.14 – Химические структуры позитивных аллостерических модуляторов нАХР.

NS 1738

NS 1738 (Рис. 3.14) представляет собой ПАМ I типа $\alpha 7$ нАХР. Его активность была исследована в отношении $\alpha 7$ нАХР крысы, экспрессированного в ооцитах *Xenopus* ($EC_{50} = 3,9$ мкМ), и $\alpha 7$ нАХР человека, экспрессируемого в гипофизарной клеточной линии GH₄C₁ ($EC_{50} = 1,6$ мкМ) [480]. При этом амплитуда наблюдаемых ионных токов в ответ на добавление АХ увеличивалась в 2 – 6 раз, однако аффинность $\alpha 7$ нАХР к АХ и его скорость десенситизации оставались практически неизменными [480]. Также было отмечено, что присутствие NS 1738 не провоцирует реакции десенситизированного рецептора на действие агониста [110]. NS 1738 является селективным в отношении $\alpha 7$

нАХР, не потенцирует $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$ нАХР, также как и 5-НТЗ рецепторы. При высоких концентрациях NS 1738 (от 10 мкМ) наблюдалось ингибирование гетеромерных нейрональных нАХР [110]. При внутрибрюшинном введении в дозах 10 и 30 мг/кг NS 1738 способен проникать в мозг и улучшать когнитивные способности у крыс [480]. Не до конца выяснено точное место связывания NS 1738 с $\alpha 7$ нАХР. Есть сведения о его возможном взаимодействии с внеклеточным доменом нАХР, затрагивающим также сегмент М2 – М3 [481]. По другим данным, NS 1738 конкурирует с PNU 120596 за связывание с внутрисубъединичным трансмембранным сайтом [110]. Это согласуется с результатами физиологического исследования, которое продемонстрировало частичное ингибирование обезболивающих эффектов PNU 120596 у мышей при внутрибрюшинном введении NS 1738 в дозе 30 мг/кг [482].

LY 2087101

LY 2087101 (Рис. 3.14) является довольно слабым ПАМ I типа в отношении $\alpha 7$ нАХР при использовании концентраций 3 – 30 мкМ [483]. Он оказывает гораздо более выраженное потенцирующее влияние на ионные токи, опосредованные активацией $\alpha 4\beta 2$ нАХР ($EC_{50} = 1$ мкМ), но не $\alpha 1\beta 1\delta\gamma$, $\alpha 3\beta 2$ или $\alpha 3\beta 4$ нАХР. Сайт-направленный мутагенез $\alpha 7$ субъединицы нАХР совместно с данными компьютерного моделирования предполагают, что связывание LY 2087101 происходит в трансмембранной внутрисубъединичной полости рецептора, основном сайте связывания ПАМ II типа [101].

PNU 120596

Впервые охарактеризованный в 2005 году PNU 120596 (Рис. 3.14) стал наиболее широко используемым ПАМ II типа $\alpha 7$ нАХР (можно обнаружить более 100 независимых исследований с его применением). PNU 120596 избирателен в отношении $\alpha 7$ нАХР ($EC_{50} = 200$ нМ), он существенно увеличивает амплитуду и длительность ионных токов, вызванных действием агониста, за счет сильного уменьшения скорости перехода рецептора в десенситизированное состояние [286]. Часто используется в различных *in vitro* исследованиях для усиления функциональных ответов $\alpha 7$ нАХР [207, 479], связываясь с внутрисубъединичным трансмембранным сайтом рецептора [101]. Соответственно, гомопентамер $\alpha 7$ нАХР содержит в своем составе пять сайтов связывания PNU 120596, каждый из которых вносит вклад в результирующее суммарное действие этого ПАМ [484].

При внутрибрюшинном введении PNU 120596 способен проникать через гематоэнцефалический барьер [482]. Показана его эффективность в ряде модельных патологических состояний у крыс *in vivo*. Так, он улучшал передачу звуковой информации (1 мг/кг в/в) [286] и когнитивные функции (2 мг/кг внутрибрюшинно) [485], облегчал состояние при ишемии головного мозга (30 мг/кг подкожно, 1 мг/кг в/в) [486] и при воспалительной гипералгезии (30 мг/кг внутрибрюшинно) [321], а также провоцировал усиление выброса дофамина (1 мг/кг внутрибрюшинно) [487]. PNU 120596 оказывал обезболивающее действие при в/в введении мышам в дозах 4 и 8 мг/кг [482]. Субхроническое введение PNU 120596 не вызывало каких-либо побочных эффектов [482], также не обнаружено цитотоксичности этого лиганда nAХР *in vitro* [488]. Уровень экспрессии $\alpha 7$ nAХР в мозге крыс не изменялся при инъекциях PNU 120596 в дозе 30 мг/кг в течение 7 дней, в отличие от аналогичного курса введения агониста, при котором наблюдался рост количества экспрессируемых рецепторов [489].

Галантамин

Галантамин (Рис. 3.14) является ингибитором ацетилхолинэстеразы, для которого достаточно давно была замечена способность потенцировать функционирование nAХР [490]. Его нельзя назвать селективным лигандом в отношении какого-либо подтипа nAХР. Под воздействием галантамина наблюдается ~30% увеличение амплитуды ионных токов, вызванных действием ненасыщающих концентраций агонистов nAХР [491]. Галантамин может вызывать одиночные микроскопические токи в мышечных и нейрональных клетках, но не способен привести к электрофизиологическому ответу на уровне целой клетки [105]. Галантамин связывается вне ортостерического сайта связывания агонистов [96] (см. главу 3.2.5.3 Аллостерические участки связывания лигандов). Весьма интересной особенностью действия галантамина является предпочтительное усиление функционирования nAХР, содержащих в своем составе $\alpha 5$ субъединицу (до 200%), что использовалось при изучении нативных гетеромерных nAХР [492]. Более высокие концентрации галантамина (> 1 мкМ) ингибируют nAХР, в этом случае он действует как блокатор открытого канала [491, 492].

Аналогично галантамину ряд других соединений действуют как слабые неселективные ПАМ nAХР, в том числе ингибитор ацетилхолинэстеразы физостигмин, опиат кодеин, нервно-мышечный блокирующий агент бензохиониум и нейротрансмиттер серотонин [105, 490]. Совокупность методов сайт-направленного мутагенеза, электрофизиологии и молекулярной динамики предполагают, что треонин 197

наиболее важен для взаимодействия этих разнообразных лигандов с нейрональными НАХР. Связывание с этим аминокислотным остатком, который находится близко к сайту связывания агонистов и Cys-петле, может объяснять потенцирующий эффект перечисленных лигандов [493].

4 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

4.1 Материалы

Таблица 4.1 – Используемые в работе плазмидные конструкции

Плаزمида	Ген, Вектор	Кем предоставлена
Субъединицы <i>nAHR</i> человека		
h α 7-pCER4	α 7 субъединица <i>nAHR</i> , pCER4	проф. Лукас Р.Д., Манчестерский университет, Великобритания
h α 3-pT7TS	α 3 субъединица <i>nAHR</i> , pT7TS	
h α 4-pSP64	α 4 субъединица <i>nAHR</i> , pSP64	
h α 9-pT7TS	α 9 субъединица <i>nAHR</i> , pT7TS	К.х.н. Дюрек Т., Институт молекулярной биологии, Университет Квинсленда, Австралия
h α 10-pT7TS	α 10 субъединица <i>nAHR</i> , pT7TS	
h β 2-pT7TS	β 2 субъединица <i>nAHR</i> , pT7TS	
Субъединицы <i>nAHR</i> крысы		
r α 7-pcDNA3	α 7 субъединица <i>nAHR</i> , pcDNA3	
r α 4-pcDNA3.1	α 4 субъединица <i>nAHR</i> , pcDNA3.1	проф. Метфессель К., Рурский университет, Германия
r β 2-pcDNA3.1	β 2 субъединица <i>nAHR</i> , pcDNA3.1	
r α 9-pGEMHE	α 9 субъединица <i>nAHR</i> , pGEMHE	
r α 10-pGEMHE	α 10 субъединица <i>nAHR</i> , pGEMHE	проф. Холльманн М., Рурский университет, Германия
Субъединицы <i>nAHR</i> мыши		
m α 1-pRBG4	α 1 субъединица <i>nAHR</i> , pRBG4	
m β 1-pRBG4	β 1 субъединица <i>nAHR</i> , pRBG4	
m ϵ -pRBG4	ϵ субъединица <i>nAHR</i> , pRBG4	проф. Витцеманн В., Институт медицинских исследований им. Макса Планка, Германия
m δ -pRBG4	δ субъединица <i>nAHR</i> , pRBG4	
Субъединица 5-HT_{3A} рецептора		
m5-HT _{3A} -pGEMHE	Субъединица 5-HT _{3A} P мыши, pGEMHE	проф. Ламмис С., Оксфордский университет, Великобритания
Субъединица химерного α7/Гли рецептора		
α 7/Gly-pMT3	Химерная субъединица α 7/ГлиР курицы, pMT3	Проф. Бржестовский П.Д., Нейробиологический институт медицины, Научный парк Люмини, Марсель, Франция
Субъединицы ГАМК_A рецептора		
m α 1-pCI	α 1 субъединица ГАМК _A P мыши, pCI	
m α 2-pCI	α 2 субъединица ГАМК _A P мыши, pCI	
m α -pCI	α 3 субъединица ГАМК _A P мыши, pCI	
m δ -pCI	δ субъединица ГАМК _A P мыши, pCI	Эрнст М., Венский медицинский университет, Австрия
m β 2-pCI	β 2 субъединица ГАМК _A P мыши, pCI	
m β 3-pCI	β 3 субъединица ГАМК _A P мыши, pCI	
m γ 2-pCI	γ 2 субъединица ГАМК _A P мыши, pCI	
Шапероны α7 <i>nAHR</i>		
NACHO-pCMV6-XL5	Шаперон NACHO человека, pCMV6-XL5	OriGene Technologies, США
RIC-3-pCMV6-XL5	Шаперон Ric3 человека, pCMV6-XL5	к.б.н. Свирщевская Е.В., ИБХ РАН, Россия
Кальциевый сенсор		
pCase12-cyto	Генетически кодируемый кальциевый сенсор Case12	Евроген, Россия

Таблица 4.2 – Используемые в работе лиганды nAHR и их аналоги

Лиганды	Происхождение	Источник	Кем предоставлен
Токсины змей			
α Bgt	<i>Bungarus multicinctus</i>	Выделение из яда	Проф. Уткин Ю.Н. (ИБХ РАН, Москва, Россия)
Alexa Fluor 488- α Bgt		Invitrogen, США	
Alexa Fluor 555- α Bgt		Invitrogen, США	
α Bgt-биотин		Invitrogen, США	
125 I- α Bgt		GE Healthcare, Великобритания	
CTX	<i>Naja kaouthia</i>	Выделение из яда [494]	Проф. Уткин Ю.Н. (ИБХ РАН, Москва, Россия)
Alexa Fluor 546-CTX		Получение конъюгата	
CTX-биотин		Получение конъюгата	
CTX-КТ (квантовые точки)		Получение конъюгата	Проф. Уткин Ю.Н. (ИБХ РАН, Москва, Россия)
NT I	<i>Naja oxiana</i>	Выделение из яда	Проф. Уткин Ю.Н. (ИБХ РАН, Москва, Россия)
NTII	<i>Naja oxiana</i>	Выделение из яда [495]	Проф. Уткин Ю.Н. (ИБХ РАН, Москва, Россия)
Ls III		Latoxan (Валенсия, Франция)	
WTX	<i>Naja kaouthia</i>	Выделение из яда [495]	Проф. Уткин Ю.Н. (ИБХ РАН, Москва, Россия)
Аземиопсин (Az)	<i>Azemiops feae</i>	Пептидный синтез	К.х.н. Жмак М.Н. (ИБХ РАН, Москва, Россия)
[125 I]-Az		Получение радиоактивного аналога	н.с. Иванов И.А. (ИБХ РАН, Москва, Россия)
Trp-Trp-Pro-Lys-Pro	Фрагмент Az	Пептидный синтез	К.х.н. Жмак М.Н. (ИБХ РАН, Москва, Россия)
пептид НАР (WRYYESSLLPYPD) и его аналоги	аналог петли С nAHR	Пептидный синтез	д.х.н. Кашеверов И.Е., к.х.н. Жмак М.Н. (ИБХ РАН, Москва, Россия)
SLURP-1	белок человека	Пептидный синтез	к.х.н. Дюрек Т. (Университет Квинсленда, Брисбан, Австралия)
SLURP-1-Alexa Fluor 488		Получение конъюгата	
SLURP-1-Alexa Fluor 546		Получение конъюгата	
SLURP-1-FITC		Получение конъюгата	
α-Конотоксины			
МII	<i>Conus</i>	Пептидный синтез	д.х.н. Кашеверов И.Е., к.х.н. Жмак М.Н. (ИБХ РАН, Москва, Россия)
[A10L]PnIA		Пептидный синтез	д.х.н. Кашеверов И.Е., к.х.н. Жмак М.Н. (ИБХ РАН, Москва, Россия)
PnIA[R5, R9, L10, R14]		Пептидный синтез	д.х.н. Кашеверов И.Е., к.х.н. Жмак М.Н. (ИБХ РАН, Москва, Россия)

¹²⁵ I-МПУ ⁰		Получение радиоактивного аналога	к.х.н. Крюкова Е.В. (ИБХ РАН, Москва, Россия)
Низкомолекулярные лиганды			
Производные хинолина q1-4		Химический синтез	проф. Романелли М.Н. (Флорентийский университет, Италия)
ВВІQА1, ВВІQА2	Яд кураре индейского племени Матис	Выделение из яда	проф. Гианнис А. (Лейпцигский университет, Германия)
6-бромогипафорин	<i>Hermisenda crassicornis</i>	Выделение из голожаберного моллюска	Акад. РАН Стоник В.А. (ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток, Россия)

Используемые в работе низкомолекулярные лиганды nАХР приобретены у компаний Sigma-Aldrich, Мюнхен, Германия и Tocris, Великобритания.

Получение флуоресцентных и биотинилированных производных трехпетельных токсинов и подобных им белков

Конъюгирование α -кобратоксина с флуоресцентным реагентом Alexa Fluor 546 NHS ester (Invitrogen, США) и биотинилирующим агентом ((+)-Biotin N-hydroxysuccinimide ester, Sigma Aldrich, Германия), а также конъюгирование SLURP-1 с флуоресцентными реагентами Alexa Fluor 488 NHS ester, Alexa Fluor 546 NHS ester (Invitrogen, США) и FITC (Sigma Aldrich, Германия) проводили согласно протоколам производителей. Разделение и очистка полученных производных проводилась методом ОФ-ВЭЖХ. Подтверждение молекулярной массы полученных соединений выполнено с помощью MALDI масс-спектрометрии.

4.2 Методы

4.2.1 Работа с животными

Препарирование спинномозговых ганглиев и участка спинного мозга крыс

Уход за животными и эксперименты на животных проводились в соответствии с действующей редакцией Закона Германии о защите животных, а также с «принципами ухода за лабораторными животными» NIH. Использовали взрослых крыс (возрастом 3 – 5 месяцев) линии Вистар. Их содержали при 12-часовом световом цикле со свободным доступом к еде и воде. Перед препарированием крыс подвергали глубокой анестезии путем ингаляции изофлурана (Baxter Deutschland GmbH, Унтершлайсхайм, Германия).

Спинномозговые ганглии и спинной мозг на уровне позвонков T1-T12 и L1-L5 выделяли сразу после анестезии и потери подошвенных и других рефлексов у крыс или после дополнительно проводимой транскардиальной перфузии с использованием 250 мл 4%-ного раствора параформальдегида в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,4.

При проведении эксперимента по пережатию нервов и по высвобождению нейромедиаторов (CGRP, глутамата), а также для выделения первичной культуры нейронов спинномозговых ганглиев соответствующие ткани использовались сразу после диссекции.

Для проведения гистохимии ткани немедленно после диссекции подвергали замораживанию в изопентане при -35°C или фиксировали путем погружения в 4%-ный раствор параформальдегида в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (pH 7,4) в течение 2 часов при комнатной температуре, промывания в PBS в течение 6 – 8 часов и инкубации в течение ночи в 18%-ном растворе сахарозы в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (pH 7,4) при 4°C .

Эксперимент по пережатию нервов в препаратах спинномозговых ганглиев и седалищного нерва

Из поясничного и грудного отдела крыс были выделены спинномозговые ганглии вместе с интактными передними и задними корешками спинного мозга и спинальным нервом. Нервы и корешки были пережаты щипчиками для остановки аксонального транспорта в месте пережатия. Аналогично была выделена и пережата часть седалищного нерва крыс. Препараты инкубировали в течение 12 ч при 37°C в буфере, содержащем 5,6 mM KCl, 136,4 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 2,2 mM CaCl₂, 11 mM глюкозы, 10 mM HEPES, pH 7,4, при постоянном насыщении раствора кислородом за счет подачи карбогена (95% O₂/5% CO₂). Затем препараты были заморожены в изопентане при -35°C и хранились при -80°C до проведения гистохимических процедур.

Препарирование головного мозга крыс и мышей

Все процедуры, проводимые с животными для подготовки образцов тканей были выполнены в соответствии с Научными процедурами, описанными в Акте о защите животных, принятом в Великобритании в 1986, и сопутствующих документах. Все процедуры также получили одобрение Этического комитета Университета г. Лидс.

Для исследования использовались молодые крысы линии Вистар возрастом 2 – 3 недели, а также гетерозиготные самцы и самки мышей линии GAD67-GFP (Δ neo)

возрастом 2 – 9 недель, которые выращивались в питомнике Университета г. Лидс. В этой линии трансгенных мышей декарбоксилаза глутаминовой кислоты (GAD67), специфический маркер для ГАМК-эргических нейронов, экспрессируется совместно с зеленым флуоресцентным белком (green fluorescent protein, GFP). Подробно эта линия была описана ранее [496].

Получение препарата мембран мозга мышей с моделью болезни Паркинсона

Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с директивой 2010/63EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых для научных целей. Модели двух стадий болезни Паркинсона, ранее разработаны и охарактеризованы в Институте биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН. Мышам (n=10) вводили с 2-х часовым интервалом две или четыре подкожные инъекции МФТП (“Sigma”, США) в дозе 12 мг/кг массы тела для получения досимптомной или ранней симптомной стадии, соответственно. Контрольным мышам (n=10) вводили физиологический раствор. Через 14 дней мышей декапитировали с использованием гильотины для мелких животных (“NEMI Scientific”, США), и выделяли стриатум и ЧС. Препараты стриатума и ЧС предоставлены акад. РАН Угрюмовым М.В. (Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия).

Выделенные отделы мозга гомогенизировали с использованием гомогенизатора Potter S (“B.Braun”, Германия) в 10-кратном объёме гипотонического буфера (2 mM HEPES, 14 mM NaCl, 0,2 mM KCl, 0,2 mM CaCl₂, 0,1 mM MgSO₄, 1 mM PMSF, pH 7,5). Гомогенат разводили в пятикратном объёме того же буфера и центрифугировали в течение 20 мин при 20000 g (ротор JA-21 “Beckman Coulter”, США). Все операции проводили при 4°C. Осадок ресуспендировали в 50-кратном объёме того же буфера, выдерживали при 37°C в течение 25 мин, после чего повторно центрифугировали в тех же условиях. Осадок ресуспендировали в гомогенизационном буфере, замораживали и хранили при -70°C. Содержание белка определяли с помощью набора Micro BSA Protein Assay Kit (“Thermo Scientific”, США), используя бычий сывороточный альбумин (БСА) в качестве стандарта.

Определение острой токсичности Az

Острая токсичность Az была оценена при внутривенном (в/в) и внутримышечном (в/м) введении самцам мышей линии ICR. Мыши линии ICR (SPF статус, возраст 6 – 9 недель, вес 29 – 34 г) обоих полов были получены из питомника Филиала Института

биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Российской Академии наук (ФИБХ РАН), г. Пущино, Россия. Животные содержались в группах по 5 – 6 мышей при 20 – 25°C, 30 – 70% относительной влажности и 12-часовом цикле свет/темнота (свет включается в 08:00). Стандартный корм для грызунов и отфильтрованная водопроводная вода были предоставлены *ad libitum*. Исследования с участием животных были одобрены Комитетом по уходу и использованию животных (IACUC) ФИБХ РАН.

Для внутривенного пути введения 20 мышей были случайным образом разделены на 5 групп по 4 животных в каждой. Животные каждой группы получали однократную дозу Az (0,3, 0,4, 0,5, 0,6 или 0,7 мг/кг, соответственно), вводимую в хвостовую вену в объеме 1 мл/кг. Для внутримышечного пути введения были сформированы две экспериментальные группы по 3 животных в каждой. Az в дозах 0,75 и 1,0 мг/кг, соответственно, вводили в четырехглавую мышцу бедра двух задних конечностей мыши в объеме 0,5 мл/кг. Для более детального исследования острой токсичности при в/м введении случайным образом были сформированы пять групп животных по 5 мышей в каждой группе. Az вводили в четырехглавую мышцу бедра двух задних конечностей мышей в дозах 0,8, 0,775, 0,75, 0,725 и 0,7 мг/кг, соответственно. Объем инъекции для каждой конечности составлял 1 мл/кг. Затем нейротоксические проявления инъекции Az у животных отслеживали и регистрировали через 5, 10, 20, 30, 60, 90 мин и 24 ч после введения, число погибших мышей также было учтено. LD50 рассчитывалась с помощью пробит-анализа. Для в/м пути введения также была определена максимально переносимая доза.

Определение острой токсичности рокурония

Рокуроний вводили внутримышечно самцам мышей линии ICR) в дозах 0,13 мг/кг (n = 1), 0,1 мг/кг (n = 4) и 0,08 мг/кг (n = 4) в трицепсы двух передних конечностей. Мыши линии ICR (SPF статус, (возраст 8 – 9 недель) были получены из питомника ФИБХ РАН, г. Пущино, Россия. Исследования с участием животных были одобрены Комитетом по уходу и использованию животных (IACUC) ФИБХ РАН. Контролем служило аналогичное введение физиологического раствора (n = 4). Объем введения составлял 0,5 мл/кг.

Определение острой токсичности фрагмента аземиопсина (WWPKP)

Определение острой токсичности пептида H-Trp-Trp-Pro-Lys-Pro-OH проводили при внутрибрюшинном и пероральном введении самцам мышей линии Balb (вес 20 – 23 г). Для внутрибрюшинного введения 20 мышей были случайным образом разделены на 5

групп по 4 животных в каждой. Пептид вводили мышам в дозах 1 мг/кг, 3 мг/кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг в 0,2 мл стерильного 0,9% раствора NaCl. Животным контрольной группы в том же объеме вводили 0,9% раствор NaCl. По результатам эксперимента не было обнаружено токсического эффекта пептида ни для одной из указанных концентраций. Для перорального пути введения пептида (DI₅₀ per os) 20 самцов мышей линии Balb (вес 20 – 23 г) случайным образом разделили на 5 равных групп. Препарат вводили животным однократно в желудок с использованием специального зонда в дозах 2,5 мг/кг, 10 мг/кг, 40 мг/кг, 160 мг/кг в 0,2 мл стерильного 0,9% раствора NaCl. Животным контрольной группы в том же объеме вводили 0,9% раствор NaCl. При введении исследуемого пептида в желудок мышам в вышеприведенных концентрациях не было обнаружено токсического эффекта.

Определение субхронической токсичности Az

Крысы инбрендной линии Sprague Dawley (9-11 недель, вес самцов 254 - 310 г, вес самок 188 - 220 г) обоих полов были получены из питомника филиала Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Российской Академии наук, г. Пушкино, Россия. Животные содержались по 2 крысы при 20 – 25°C, 30–70% относительной влажности и 12-часовом цикле свет/темнота (свет включается в 08:00). Стандартный корм для грызунов и отфильтрованная водопроводная вода были предоставлены *ad libitum*. Исследования с участием животных были одобрены Комитетом по уходу и использованию животных (IACUC) (ФИБХ РАН).

Исследование субхронической токсичности Az проводилось при его ежедневном введении взрослым крысам линии Sprague Dawley в течение 14 дней с последующим 14-дневным периодом отмены. В исследовании использовали 36 самцов и 36 самок крыс в возрасте 10-11 недель к началу эксперимента, которые были случайным образом разделены на три группы. Тестируемый препарат Az вводили в виде раствора в четырехглавую мышцу бедра в дозах 0,1 мг/кг (первая группа животных) и 0,5 мг/кг (вторая группа животных). Контрольной (третьей) группе крыс вводили физраствор в том же объеме.

В ходе прижизненной фазы исследования у животных регистрировали клинические признаки возможной интоксикации, массу тела и потребление ими корма. В конце прижизненной фазы исследования половина крыс была подвергнута эвтаназии помещением в CO₂-камеру на 15-й день исследования, вторая половина животных – после 2-х недельного периода отмены (на 29-й день исследования). По окончании исследования

был выполнен гематологический и биохимический анализ сыворотки крови; все животные были вскрыты, органы осмотрены на наличие макроповреждений и взвешены, а также был выполнен гистологический анализ органов и тканей. Для следующих органов была рассчитана относительная масса (отношение веса органа к массе тела животного): головной мозг, сердце, печень, селезенка, тимус, почки, легкие, яички и яичники.

Гистологический анализ был проведен для ряда органов: почки, надпочечники, яички, яичники, селезенка, тимус, головной мозг, сердце, легкие, печень, лимфатические узлы (брыжеечный и нижнечелюстной), желудок, кожа и мышцы места инъекции.

При биохимическом анализе учитывались следующие параметры сыворотки крови: уровень аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, глутаматдегидрогеназы, щелочной фосфатазы, гамма-глутамилтрансферазы, мочевины, креатинина, общего билирубина, общего белка, альбумина, глобулина, фосфора, кальция, общего холестерина, триглицеридов, а также соотношение уровней альбумина и глобулина. Биохимический анализ проводился с использованием наборов реагентов Randox GB и автоматического биохимического анализатора Sapphire-400 (Tokyo Boeki Ltd., Токио, Япония).

Гематологический анализ крови животных включал оценку числа эритроцитов, лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов, уровня гемоглобина, гематокрит, содержания гемоглобина в эритроците, среднего объема эритроцита, широты распределения эритроцитов по объему, среднего объема тромбоцитов, тромбокрит, широты распределения тромбоцитов по объему. Анализ был выполнен с использованием гематологического анализатора Mythic 18 Vet (C2 DIAGNOSTICS S.A., Монпелье, Франция).

Фармакокинетика Az

Мыши линии ICR (SPF статус, возраст 6 – 9 недель, вес 29 – 34 г) были получены из питомника ФИБХ РАН, г. Пущино, Россия. Исследования с участием животных были одобрены Комитетом по уходу и использованию животных (IACUC) ФИБХ РАН. Исследование фармакокинетических параметров Az проводили с использованием 163 самцов мышей ICR, которые были случайным образом распределены в четыре экспериментальные группы по 40 животных в каждой и одну контрольную группу, в которую вошли три интактные мыши. Животным первых двух экспериментальных групп вводили внутривенно 0,25 и 0,50 мг/кг йодированного Az ($[^{125}\text{I}]\text{-Az}$), соответственно. Животным третьей и четвертой экспериментальных групп внутримышечно вводили 0,25 и 0,50 мг/кг $[^{125}\text{I}]\text{-Az}$, соответственно. Для оценки скорости выведения Az образцы крови

животных были взяты из орбитального синуса через 5, 15, 30, 60 мин и 1, 2, 4 и 24 ч после введения [^{125}I]-Az. Полученные образцы крови взвешивали и для каждой указанной временной точки концентрация [^{125}I]-Az рассчитывалась как среднее значение в образцах крови пяти животных. Концентрация [^{125}I]-Az в образцах крови была измерена с использованием γ -счетчика Wallac 1470 WIZARD® (Perkin Elmer, США) с учетом его удельной радиоактивности ($6,26 \cdot 10^7$ cpm/мг) на момент проведения измерений. Для всех количественных исходных данных подсчитана описательная статистика. Определены основные фармакокинетические параметры ($\text{AUC}(0 \rightarrow t)$, C_{\max} , $T_{1/2}$), позволяющие оценить процессы выведения и элиминации Az.

Определение иммуотоксичности Az

Для выявления потенциальной иммуотоксичности Az были проведены три независимых теста:

- (1) оценка воздействия препарата на клеточный иммунитет по реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ),
- (2) оценка иммунного ответа животных на стандартный антиген,
- (3) оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов.

Мыши линии ICR (SPF статус, возраст 6 – 9 недель, вес 29 – 34 г) были получены из питомника ФИБХ РАН, г. Пущино, Россия. Исследования с участием животных были одобрены Комитетом по уходу и использованию животных (IACUC) ФИБХ РАН. Для проведения этих экспериментов использовали 90 самцов мышей ICR, которые были разделены поровну на три группы (30 животных в группе) для каждого исследования. Внутри этих групп они были разделены на подгруппы по 10 мышей в каждой. Мышам первой подгруппы вводили физраствор в/м, животным второй и третьей подгрупп – Az (0,15 и 0,5 мг/кг в/м, соответственно). Препараты вводили в четырехглавую мышцу бедра двух задних конечностей мышей в течение 7 дней в объеме 1 мл/кг).

Оценка воздействия препарата на клеточный иммунитет по реакции гиперчувствительности замедленного типа

По окончании курса введения Az мыши первой группы (30 животных) были иммунизированы раствором тринитробензолсульфоновой кислоты (ТНБС) (200 мкл, 10 мМ, Sigma Aldrich, Мюнхен, Германия) подкожно в основание хвоста. Через 6 дней животных вторично иммунизировали ТНБС (50 мкл, 10 мМ) в подушечку левой задней лапы, тот же объем физиологического раствора вводили в контрольную правую заднюю

лапу. Через 24 ч после второй иммунизации животных подвергали эвтаназии в CO₂-камере и определяли вес их экспериментальных и контрольных лап. Индекс реакции был рассчитан как разница в весе экспериментальной и контрольной лап, нормализованная на вес экспериментальной лапы.

Оценка иммунного ответа животных на стандартный антиген

По окончании курса введения Az мыши второй группы (30 животных) были иммунизированы внутривнутрибрюшинно эмульсией 200 мкл бычьего сывороточного альбумина (БСА, 0,5 мг/мл) в полном адьюванте Фрейнда (соотношение 1:1). Через 10 дней после 1-й иммунизации мыши получали вторую 200 мкл внутривнутрибрюшинную инъекцию антигена (БСА, 0,5 мг/мл) в неполном адьюванте Фрейнда (соотношение 1:1). Через 7 дней кровь отбирали из нижней полой вены мышей, затем определяли титры антител IgG к БСА в сыворотке крови с использованием стандартного иммуноферментного анализа.

Оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов

По окончании курса введения Az мышам третьей группы (30 животных) внутривнутрибрюшинно вводили 2 мл суспензии частиц туши. Через 10 минут мышей подвергали эвтаназии в CO₂-камере с последующим выделением перитонеального экссудата из их брюшной полости. С помощью камеры Горяева в экссудате (1 мкл) было подсчитано общее количество перитонеальных макрофагов и количество фагоцитирующих клеток, содержащих частицы туши.

Аллергенность Az

Мыши линии ICR (SPF статус, возраст 6 – 9 недель, вес 29 – 34 г) были получены из питомника ФИБХ РАН, г. Пушино, Россия. Исследования с участием животных были одобрены Комитетом по уходу и использованию животных (IACUC) ФИБХ РАН. Аллергенность Az (DNWWPKPPHQGPRPPRPRPKP) была изучена в тесте гиперчувствительности замедленного типа при использовании 20 самцов и 20 самок взрослых мышей ICR. Мыши были разделены на четыре группы (две контрольные и две экспериментальные группы) по 10 животных (самцов или самок) в группе. Мышам экспериментальной группы вводили подкожно в основание хвоста эмульсию Az (0,15 мг/кг) в полном адьюванте Фрейнда (соотношение 1: 1, 2 мл/кг). Мышей контрольных групп иммунизировали эмульсией нормального физиологического раствора в полном адьюванте Фрейнда. Пять дней спустя все животные получали разрешающую инъекцию

Az (0,15 мг/кг, 1,33 мл/кг) в подушечку левой задней лапы. Для оценки интенсивности аллергической реакции через 6, 12 и 24 ч после второго введения Az измеряли толщину левой и правой задних лап мышей штангенциркулем.

Оценка миорелаксантажной активности Az

Мыши линии ICR (SPF статус, возраст 6 – 9 недель, вес 29 – 34 г) были получены из питомника ФИБХ РАН, г. Пущино, Россия. Исследования с участием животных были одобрены Комитетом по уходу и использованию животных (IACUC) ФИБХ РАН. 40 самцов мышей ICR поровну разделили на четыре группы: одну контрольную и три экспериментальные. Животным трех экспериментальных групп вводили в трицепсы передних конечностей (в объеме 0,5 мл/кг) Az в дозах 0,03, 0,1 и 0,3 мг/кг, соответственно. Мышам контрольной группы аналогичным образом вводился физиологический раствор. Дополнительно шести мышам инъецировалась доза Az 0,01 мг/кг. Перед введением веществ для всех животных была зафиксирована их базовая сила захвата передними конечностями планки измерительного прибора 1027 grip strength meter (Columbus Instruments, Колумбус, Огайо, США). После введения веществ этот показатель регистрировали через 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 минут. При проведении эксперимента с введением рокурония сокращали время наблюдения до пяти минут, т.е. проводили регистрацию силы захвата через 1, 2, 3, 4, 5 минут после внутримышечной инъекции в связи с кратковременностью эффекта.

4.2.2 Молекулярно-биологические методы

Трансформация бактериальной культуры компетентных клеток *E. coli* штамма XL1-Blue

Трансформация проводилась методом теплового шока. К 50 мкл суспензии компетентных клеток *E. coli* штамма XL1-Blue добавляли 1 – 5 нг плазмидной ДНК и помещали образец на 20 мин в лёд. Затем клетки инкубировались при температуре 42 °С в течение 40 сек в воздушном термостате (Биокот, Россия) и далее снова переносились в лёд для охлаждения в течение 3 – 5 мин. К образцу добавляли 150 – 250 мкл питательной среды SOC и помещали образец в бактериальный шейкер (CertomatRH, Германия) на 45 мин при 37°С. Весь объем полученной смеси наносили на чашку Петри, где находилась агаризованная среда LB, содержащая ампициллин (Ф-Синтез, Россия) в концентрации 100 мкг/мл или канамицин (Биосинтез, Россия) в концентрации 50 мкг/мл. Чашки Петри

инкубировали в течение 24 ч в термостате при постоянной температуре 37°C. На следующий день пересевали один из выросших на чашке Петри клонов в жидкую среду LB (в объеме 5 – 50 мл), содержащую селективный антибиотик, и суспензию помещали в бактериальный шейкер на 10 – 20 часов при 37°C. Далее проводили выделение плазмидной ДНК из культуры бактериальных клеток.

Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в агарозном геле

Образцы нуклеиновых кислот смешивали с буфером для нанесения образцов (6X Mass Ruler DNA Loading Dye, Thermo Scientific, Литва), 3-10 мкл смеси наносили в лунки 1%-ного агарозного геля (Helicon, Россия) приготовленного на основе 1X TAE буфера (Thermo Scientific, Литва) с добавлением 0,4 мкг/мл бромистого этидия (Pharmacia, Швеция). Далее гель переносили в камеру для горизонтального электрофореза (Helicon, Россия), заполненную 1X TAE буфером и проводили электрофоретическое разделение при 105 В и 250 мА в течение 20-30 мин. Нуклеиновые кислоты в геле визуализировали в ультрафиолетовом свете, используя УФ-трансиллюминатор (Ultra Violet Products, США), и фиксировали результаты с помощью высокочувствительной черно-белой видеокамеры КРС-650ВН (КТ&С, Южная Корея).

Выделение, очистка и анализ образцов нуклеиновых кислот

Для выделения ДНК из агарозного геля и реакционных смесей использовался набор реактивов CleanupMini; выделение проводили согласно протоколу фирмы-производителя (Евроген, Россия).

Для выделения плазмидной ДНК из культуры бактериальных клеток использовались наборы реактивов для выделения и очистки ДНК Plasmid Miniprep и Midiprep; выделение проводили согласно протоколу фирмы-производителя (Евроген, Россия).

Для выделения РНК из реакционных смесей использовался набор реактивов для выделения и очистки РНК из реакционных смесей RNeasy MinElute Cleanup Kit; выделение проводили согласно протоколу фирмы-производителя (Qiagen, Нидерланды). Все манипуляции с пробами проводили в отдельном ламинарном боксе.

Концентрацию нуклеиновых кислот в образцах измеряли с использованием специализированной спектрофотометрической кюветы (Hellma, США) при $\lambda=260$ нм (за вычетом оптической плотности образца при $\lambda=340$ нм) с помощью спектрофотометра DU-65 (Beckman, США).

Секвенирование проводили в компании Евроген (Россия). Подготовку образцов для секвенирования проводили согласно инструкциям на сайте компании. Необходимые праймеры предоставлялись компанией Евроген. Анализ хроматограмм осуществлялся при помощи программы Chromas Lite 2.1 (Technelysium, Австралия) и онлайн-ресурса BLAST, Basic Local Alignment Search Tool (NCBI, США).

Сайт-направленный мутагенез

Сайт-направленный мутагенез проводили методом кольцевого синтеза. Мутации S67K и K67S в последовательности генов $\alpha 1$ и $\alpha 2$ субъединиц ГАМК_A-рецептора, соответственно, вносили с помощью праймеров, содержащих необходимые нуклеотидные замены: прямой (F) праймер 5-gtgttttccgssaaaagtggaaggatgaaagattaaaattc-3 и обратный (R) праймер 5-catccttccagctttggcggaaaaacacatctattg-3 (для S67K); прямой (F) праймер 5-gctcgtcttccagctttgtcgaagaacacacatctattg-3 и обратный (R) праймер 5-ctttcgacaaaagctggaagacgagcggttaaaatttaag-3 для (K67S). Подбор праймеров осуществляли с помощью онлайн-программы QuikChange Primer Design (Agilent Technologies, США), с дальнейшей оптимизацией их структуры для повышения эффективности прохождения ПЦР [497]. Состав реакционной смеси и условия проведения ПЦР указаны в Таблице 4.3.

Таблица 4.3. Состав реакционной смеси и условия проведения ПЦР

Состав смеси ПЦР		Условия ПЦР			
Компонент	Конечная(-ое) концентрация/ количество	Стадия	Количество циклов	Температура	Время инкубации
Стерильная вода	до 25 мкл	Предварительная денатурация	1	98 °С	2 мин
5X Phusion GC буфер	1X				
Смесь dNTP	200 мкМ каждого	Денатурация		98 °С	20 с
ДНК-матрица*	100 нг	Отжиг	25	65 - 70 °С	1 мин
Праймер – F	0,5 мкМ	Элонгация		72 °С	3 мин
Праймер – R	0,5 мкМ				
Phusion Hot Start ДНК полимеразы	0,02 ед./мкл	Заключительный этап	1	72 °С	10 мин

*ДНК-матрица: $\alpha 1$ -pCI, $\alpha 2$ -pCI

В качестве отрицательного контроля использовали реакционную смесь, содержащую все компоненты, кроме ДНК полимеразы. Реакцию проводили в ПЦР-амплификаторе с

градиентом температур и с нагреваемой крышкой (Eppendorf, Германия). После проведения ПЦР и выделения и очистки продуктов реакции для удаления метилированной материнской ДНК пробы обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *DpnI* (10 ед. фермента для 1 мкг ДНК) в соответствующем буфере CutSmart (New England Biolabs, Канада). Образцы инкубировали минимум 2 часа при температуре 37°C. Затем проводили трансформацию компетентных клеток *E.coli* штамма XL1-Blue (Евроген, Россия) *DpnI*-обработанными продуктами и далее проводили выделение плазмидной ДНК. Для подтверждения результатов сайт-направленного мутагенеза полученные плазмидные ДНК секвенировали.

Получение мРНК

Плазмидные конструкции (по 10 мкг) $\alpha 3$ -pT7TS, $\alpha 9$ -pT7TS, $\alpha 10$ -pT7TS, $\beta 2$ -pT7TS, $\beta 4$ -pT7TS $\alpha 7$ -pcDNA3 обрабатывались эндонуклеазой рестрикции *XbaI*, конструкции $\alpha 4$ -pSP64, $\alpha 7$ -pMXT – *BamHI* и конструкция m5-NT_{3A}-pGEMHE – *NheI* (100 единиц фермента, New England Biolabs, Канада) в присутствии соответствующих буферов (в конечной концентрации 1X) в конечном объеме 50 мкл. Успешность стадии линейаризации проверялась электрофоретическим разделением ДНК в 1% агарозном геле. Затем выделяли линейаризованные продукты при помощи набора для очистки ДНК из реакционных смесей CleanupMini (Евроген, Россия) и проводили спектрофотометрическое измерение концентрации ДНК в растворе.

Синтез мРНК проводился с помощью наборов для синтеза мРНК T7 и SP6 mMessageMachine® transcription kit (AMBION, США). Состав реакционной смеси указан в Таблице 4.4. Образцы инкубировали при 37° С на водяной бане (BioSan, Россия) в течение 2 часов.

Таблица 4.4. Состав реакционной смеси для синтеза мРНК

<i>Компонент</i>	<i>Конечная(-ое) концентрация/ количество</i>
Вода, не содержащая РНКаз	до 10 мкл
10X буфер	1X (1 мкл)
2X NTP/CAP	1X (5 мкл)
ДНК-матрица*	650 нг
Ферментная смесь	1 мкл

*Линейаризованные плазмидные конструкции

К реакционной смеси добавляли 0,5 мкл раствора TURBO DNase из набора для синтеза мРНК T7 или SP6 mMessageMachine® transcription kit (AMBION, США) и инкубировали при 37° С на водяной бане (BioSan, Россия) в течение 15 мин. После проводили выделение синтезированной РНК из реакционных смесей при помощи RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen, Нидерланды) и проверяли успешность синтеза РНК электрофоретическим разделением РНК в 1%-ном агарозном геле. Затем рассчитывали концентрацию РНК в растворе спектрофотометрическим методом.

ПЦР с обратной транскрипцией

С использованием набора RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen GmbH, Hildene, Германия) были выделены препараты РНК из перитонеальных нейтрофилов и головного мозга самцов мышей BALB/c в соответствии с протоколом производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью системы ImPromITMRT (Promega, Madison, WI, USA) в соответствии со стандартной методикой производителя с использованием праймеров Oligo(dT)₁₅, в реакции использовали 0,5 мкг выделенной РНК. Полученные библиотеки кДНК использовали для проведения ПЦР с использованием праймеров, специфичных для последовательностей генов различных субъединиц nAXP (Таблица 4.1), и TrueStart Hot Start Taq ДНК-полимеразы (Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США). В контрольных экспериментах в приготовленных смесях для проведения ПЦР отсутствовала ДНК-полимераза, матрица (кДНК) или праймеры. Условия ПЦР были следующими: нагрев до 94°С в течение 3 мин, затем 40 последовательных циклов нагрева до 94°С в течение 15 – 30 с, до 54–59,5°С в течение 15 – 30 с и до 72°С в течение 1 мин. Продукты ПЦР анализировали с использованием гель-электрофореза в 1,5% агарозном геле (AppliChem GmbH, Германия), после чего секвенировали ПЦР-продукты соответствующей длины в компании Евrogen, Россия.

4.2.3 Клеточные работы

Культивирование и трансфекция клеточных линий Neuro2a и НЕК293Т

Культивирование и субкультивирование клеток проводилось в стерильных условиях. Клетки линий мышинной нейробластомы Neuro2a и НЕК293Т (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия) содержались в культуральных флаконах 25 см² (Corning, США), наполненных ростовой средой, состоящей из среды DMEM (ПанЭко, Россия), эмбриональной телячьей сыворотки (FBS, PAA Laboratories GE, Австрия) в количестве

10%, антибиотика гентамицина (КРКА, Россия) в концентрации 50 мкг/мл и антимикотика амфотерицина В (Ф-Синтез, Россия) в концентрации 2,5 мкг/мл при 37° С в CO₂-инкубаторе MCO-15AC (Sanyo, Япония) с 5%-ным содержанием CO₂. При достижении плотности клеток во флаконе равной 400000 клеток/мл проводилось субкультивирование клеток с помощью раствора Версена (ПанЭко, Россия) в новый флакон в концентрации 50000 клеток/мл.

За сутки до проведения процедуры трансфекции клетки рассеивали на стекла диаметром 12 мм, обработанные полилизинном (10 мг/л), в количестве 25000 клеток/стекло или в 96-луночные черные планшеты с прозрачным (Eppendorf, Germany) или непрозрачным (Corning, США) дном (5000 клеток/луночка). Процедуру трансфекции клеток с помощью липофектамина (Invitrogen, США) проводили согласно протоколу производителя. Использовали плазмиды, кодирующие $\alpha 7$ nAChR (human $\alpha 7$ nAChR-pCER4, rat $\alpha 7$ nAChR-pcDNA 3.1 / Hygro (+)), шаперон Ric-3 (Ric3-pCMV6-XL5, OriGene, США) или NACHO (TMEM35-pCMV6-XL5, OriGene, США) и флуоресцентный белковый кальциевый сенсор Case12 (pCase12-cyto vector, Evrogen, Russia) в молярном соотношении 4: 1: 1. Для экспрессии мышечного $\alpha 1\beta 1\epsilon \delta$ nAChR мыши использовали смесь плазмид, кодирующих соответствующее субъединицы рецептора (pRBG4-вектор), и сенсор Case12, шаперон не требовался. Через 48 – 72 часа наблюдалась максимальная экспрессия исследуемых рецепторов и белкового кальциевого индикатора Case12 в клетках.

Флуоресцентный анализ ГАМК_A-рецепторов

Клетки мышечной нейробластомы Neuro2a, выращенные в прозрачных 96-луночных культуральных планшетах, трансфицировали смесью лабораторных плазмид pCI (m $\alpha 1$ -pCI, m $\beta 3$ -pCI, m $\gamma 2$ -pCI в соотношении 1:1 или 1:1:1), кодирующих различные субъединицы ГАМК_A-рецептора, совместно с GFP-кодирующей плазмидой (Евроген, Россия) с использованием реагента липофектамина (Invitrogen) согласно протоколу производителя. Трансфицированные клетки выращивали в среде DMEM (Панеко, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (РАА Laboratories, Австрия) при 37°С в CO₂-инкубаторе MCO-15AC (Sanyo, Япония) в течение 48 часов. После отбора ростовой среды клетки промывали буфером следующего состава: 20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,8 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM глюкозы, pH 7,4. Затем к клеткам добавляли раствор 50 нМ Alexa Fluor 555- α Bgt (Таблица 4.2, Invitrogen, США) или Alexa Fluor 546-CTX (Таблица 4.2) в том же буфере и проводили инкубацию в течение 20 мин при комнатной температуре. В контрольных экспериментах 50-кратный молярный

избыток α Bgt или СТХ был добавлен в смесь для инкубации. В опытах по конкурентному анализу в смесь для инкубации добавляли 1-4000 мкМ мусцимола или 400 мкМ диазепамы или преинкубировали клетки в течение 15 мин с 50 мкМ d-ТС, ВВІQA1 или ВВІQA2. После проведения связывания флуоресцентных токсинов клетки промывали тем же буфером и полученную окраску анализировали с использованием эпифлуоресцентного микроскопа Olympus IX-70 (Olympus, Япония), оснащенным цифровой ПЗС-камерой XM10 (Olympus, Япония) и соответствующим набором светофильтров. и программного обеспечения CellA (Olympus, Япония) и ImageJ (1.43N, Национальный институт здравоохранения, США) со стандартным набором плагинов.

Интенсивность флуоресценции количественно определяли следующим образом: поле зрения фотографировали в двух каналах для обнаружения флуоресцентного токсина (красный канал) и для обнаружения GFP (зеленый канал). Фон изображений был вычтен, а затем были найдены максимальные по интенсивности области на изображении с флуоресценцией GFP, после чего выбранные автоматически поля были откорректированы вручную для соответствия отдельным клеткам. Эти поля были использованы для подсчета средней интенсивности флуоресценции связавших α -нейротоксин клеток. В каждой лунке фотографировались 2–4 случайно выбранных поля зрения, эксперимент включал как минимум по три лунки для каждой комбинации лигандов.

Вестерн блот анализ клеток GH₄C₁ с использованием антител α 7(8-25)

Вестерн блот анализ проводился для подтверждения иммуноспецифичности кроличьих поликлональных антител α 7(8-25), полученных и охарактеризованных ранее [498]. Рекombинантный внеклеточный домен α 7 субъединицы nAHP крысы [499] был использован в качестве модельного антигена. Для проверки иммунореактивности антител α 7(8-25) в отношении полноразмерного α 7 nAHP был приготовлен лизат и аффинно-очищенная (с использованием α -кобратоксина) фракция клеток GH₄C₁, экспрессирующих человеческий α 7 nAHP (суспензия мертвых клеток; предоставлены EliLilly, Великобритания). Стоит отметить, участки 8-25 аминокислотной последовательности α 7 субъединицы nAHP крысы и человека абсолютно гомологичны (YKELVKNYNPLERPVAND).

Для приготовления лизата клетки GH₄C₁ (8 мг белка) были ресуспендированы в 10 мл 20 мМ натрий-фосфатного лизирующего буфера (pH 8,0), содержащего 1 мМ ЭДТА, смесь ингибиторов протеаз, 1% Тритон X-100, и полученная суспензия инкубировалась при постоянном перемешивании в течение ночи при 4°C. После центрифугирования при

10000 g в течение 30 минут 0,5 мл супернатанта было отобрано для проведения электрофореза в ПААГ и Вестерн блот анализа лизата клеток GN₄C₁ (фракция 1). К оставшему супернатанту было добавлено 30 мкл конъюгата α -кобратоксина с CN сефарозой 4В (GE Healthcare, Швеция) и инкубация проводилась при постоянном перемешивании в течение ночи при 4°C (получение фракции 2). Получение конъюгата (5 мг токсина/мл среды) проводилось согласно инструкции производителя. Для проверки неспецифической сорбции белков к 10 мл лизата, полученного описанным выше способом, добавляли 30 мкл свободной CN сефарозы 4В и аналогично инкубировали при постоянном перемешивании в течение ночи при 4°C (получение фракции 3). Конъюгированную и свободную сефарозу отделяли от лизата последовательным центрифугированием при 1000 g в течение 5 минут и промывки 1 мл лизирующего буфера. После четырехкратной промывки связавшиеся с сефарозой белки элюировали добавлением 40 мкл электрофоретического буфера для нанесения образцов с соответствующим нагревом до 95°C в течение 5-10 мин. Затем белки были разделены электрофоретически в ПААГ и перенесены на мембрану Immobilon (Millipore, Массачусетс, США) для проведения Вестерн блот анализа. Мембрана инкубировалась в течение 2 часов с 5%-ным раствором обезжиренного молока в PBS, а затем в течение ночи при 4°C с антителами α 7(8-25) (30 мг/мл) в PBS, содержащем 0,5% молока и 0,1% Твин-20. После промывки в том же буфере к мембране были добавлены вторичные ослиные антитела к иммуноглобулинам кролика, конъюгированные с пероксидазой (1:1500, Amersham Biosciences, Швеция). Детекция пероксидазной активности проводилась с помощью таблеток SIGMAFAST™, содержащих 3,3'-диаминобензидин (Sigma-Aldrich, США). В качестве отрицательных контролей использовали антитела α 7(8-25), преинкубированные с 10-кратным молярным избытком соответствующего пептида (YKELVKNYNPLERPVAND), а также иммуноглобулины нормальной сыворотки кролика.

Первичная культура нейронов тройничного ганглия крысы

Методика приготовления культуры клеток тройничного ганглия крыс (P9 – P13) подробно описана ранее [500]. Животные были предоставлены питомником Университета Восточной Финляндии. Клетки тройничных ганглиев самцов крыс сразу после препарирования были ферментативно диссоциированы в течение 20 мин с помощью раствора ферментов: трипсина (0,5 мг/мл, Sigma-Aldrich), коллагеназы (1 мг/мл, Sigma-Aldrich) и ДНКазы (0,2 мг/мл, Sigma-Aldrich). Изолированные клетки высевали на покровные стекла, покрытые поли-L-лизином (0,2 мг/мл, Sigma-Aldrich, МО, США), и

культивировали в культуральной среде F12 (Gibco, США) при 37°C и 5% CO₂ в течение 48 часов до проведения экспериментов.

Первичная культура нейронов спинномозговых ганглиев

Процедуру выделения первичной культуры афферентных нейронов взрослых крыс проводили, как описано ранее [501, 502] с некоторыми модификациями. Выделенные спинномозговые ганглии инкубировали в ферментной смеси коллагеназы (2 мг/мл) и диспазы II (2 мг/мл) (Sigma-Aldrich, Германия) в солевом растворе Хенкса, не содержащем кальция и магния (Invitrogen, США), в течение 15 мин при 37°C, после чего нейроны механически диссоциировали путем пропускания (20-30 раз) через горлышко стеклянной пипетки Пастера. Эту стадию повторяли три раза. Затем клетки промывали и осаждали центрифугированием (три раза при 1000 g в течение 2 минут) и суспендировали в среде L15 (Invitrogen, США), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS). Суспензию клеток переносили на покровные стекла, покрытые смесью поли-D-лизина и ламинина (Sigma-Aldrich, Германия), для проведения кальциевого имиджинга или в лунки 24-луночного культурального планшета для измерения высвобождения нейромедиаторов (помещали суспензию, приготовленную из 2 ганглиев, в одну лунку планшета). После прикрепления нейронов к поверхности стекла/пластика в течение 2 часов, к стеклам и в лунки планшета добавляли ростовую среду (L-15, 10% FBS) и растили клеточную культуру в течение 20-24 часов при 37°C.

Измерение высвобождения нейромедиатора CGRP нейронами спинномозговых ганглиев

Для исследований высвобождения CGRP использовали первичную культуру нейронов спинномозговых ганглиев и интактные ганглии. Интактные спинномозговые ганглии помещали в лунки культурального планшета и последовательно (по 15 мин) инкубировали при 35–37°C с насыщенным кислородом буфером Locke, содержащем (в мМ): NaHCO₃ 14,3, NaH₂PO₄ 1,2, KCl 5,6, NaCl 136, MgCl₂ 1,2, CaCl₂ 2,2 и D-глюкозу 10, а также с растворами исследуемых веществ на его основе. Первичные клеточные культуры подвергались аналогичной смене растворов после отбора ростовой среды, но интервалы инкубации были уменьшены до 10 мин. Для определения базового уровня высвобождения CGRP препаратами собирали для последующего анализа пятый по счету раствор буфера Locke, собранный за 15 и 10 минут инкубации со спинномозговыми ганглиями и первичной культурой нейронов, соответственно. Затем образцы подвергали

последовательной инкубации с буфером Locke или растворами исследуемых веществ на его основе. Супернатанты собирали с 10-минутными интервалами для культуры нейронов и с 15-минутными интервалами для ганглиев и анализировали на содержание CGRP с помощью наборов для радиоиммуноанализа (RIA, Phoenix Pharmaceuticals, США) и для иммуноферментного анализа (CGRP EIA kit, Bertin Pharma, Франция) в соответствии с протоколом производителя. В конце эксперимента культуры клеток спинномозговых ганглиев подвергали воздействию 2N уксусной кислоты в течение 10 минут для определения общего внутриклеточного содержания CGRP. Для последующего анализа собранные аликвоты инкубации разбавляли в десять раз.

Надежность CGRP EIA kit (Bertin Pharma, Франция) была проверена с использованием спинномозговых ганглиев мышей, нокаутных по гену CGRP (предоставлены проф. Куммером В. (Институт анатомии и клеточной биологии, г. Гиссен, Германия)), в сравнении с ганглиями мышей дикого типа. Экстракты из спинномозговых ганглиев были приготовлены в соответствии с протоколом, описанным ранее [503]. 10 ганглиев помещали в 0,25 мл 1 М уксусной кислоты и кипятили в течение 5 минут. Затем ганглии механически гомогенизировали и полученную суспензию центрифугировали в течение 20 мин при 960 g и 4°C). Полученные супернатанты собирали, лиофилизировали и хранили при -80°C до проведения анализа. Непосредственно перед началом анализа с использованием CGRP EIA kit (Bertin Pharma, Франция) лиофилизаты были растворены в 100 мкл EIA-буфера. Образцы анализировали в разведении 1:100.

Выделение ооцитов *Xenopus laevis*

Взрослые самки *X. laevis* были куплены в фирме NASCO (Форт Аткинсон, Висконсин, США) и содержались при 12-часовом световом цикле при температуре 18–20°C. Перед проведением хирургических манипуляций взрослая самка *Xenopus laevis* (>10 см) помещалась в холодный раствор анестетика бензокаина 0,5 г/л (Sigma-Aldrich, США) на 15-30 мин до полного обездвиживания лягушки. Путем прямой диссекции брюшной полости самки, находящейся на льду, извлекали фрагмент яичника, который затем помещали в буфер Barth, содержащий 88 мМ NaCl, 1.1 мМ KCl, 2.4 мМ NaHCO₃, 0.3 мМ Ca(NO₃)₂, 0.4 мМ CaCl₂, 0.8 мМ MgSO₄ и 15 мМ HEPES-NaOH; pH 7.6, и обрабатывали раствором 4 мг/мл коллагеназы I типа (Life Technologies, USA) в течение 1,5 – 2 часов при комнатной температуре. После отдельные ооциты IV и V стадии переносились в буфер Barth для инкубации ооцитов, дополнительно содержащий 40 мкг/мл гентамицина и 100 мкг/мл ампициллина.

В некоторых экспериментах буфер Barth был заменен на буфер ND96, содержащий (в мМ) 5 HEPES/NaOH, 96 NaCl, 2 KCl, 1,8 CaCl₂, 2 MgCl₂, pH 7,6.

Выделение перитонеальных нейтрофилов мышей

Препараты перитонеальных нейтрофилов мышей были предоставлены к.б.н. Сафроновой В.Г. (Институт биофизики клетки РАН, г. Пущино, Россия). Для развития острой воспалительной реакции мышам линий C57Bl/6 и BALB/c (вес 23–27 г) внутрибрюшинно вводили суспензию зимозана (5 мг/мл), объем инъекции составлял 150 мкл. Животные были приобретены в питомнике филиала Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Российской академии наук в г. Пущино. Все эксперименты проводились в соответствии с протоколами Комиссии по уходу и использованию животных № 12306 (2006) Института биофизики клетки РАН (Пущино, Россия). Спустя 5 ч после инъекции зимозана животных декапитировали и промывали брюшную полость 3 мл сбалансированного солевого раствора Хенкса, не содержащего Ca²⁺ (HBSS, pH 7,4, 4°C). Полученную суспензию отбирали и центрифугировали при 600 g в течение 5 минут при 4°C. Чистота популяции осажденных полиморфноядерных нейтрофильных гранулоцитов (нейтрофилов) превышала 95% согласно оценке с помощью люминесцентной микроскопии (Leica DM6500, ×40) с антителами против Gr-1 (PE-anti-mouse Ly6G/Ly6C) и бисбензимидам H 33258. Выживаемость клеток составляла 97 – 99%, что было определено окраской с трипановым синим. Выделенные клетки инкубировали в HBSS без Ca²⁺ в течение 1 часа при 4°C перед последующими экспериментами.

Хемилюминесцентный анализ продукции активных форм кислорода нейтрофилами

Продукцию активных форм кислорода (АФК) нейтрофилами определяли с помощью люминол-зависимой хемилюминесцентной техники, как было описано ранее [504]. Использовался хемилюминометр CHEMLUM-12 (Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия). Изучалось влияние предварительной обработки нейтрофилов лигандами nAHP на их способность продуцировать АФК, реакция инициировалась добавлением хемотактического трипептида бактерий fMLF (N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine). В каждом независимом эксперименте использовали 12 миникувет с нейтрофилами (200 мкл; 10⁶ клеток/мл). Образцы клеток, приготовленные в триплете, были: (i) интактными - контроль; (ii) обработанными агонистом nAHP; (iii) обработанные антагонистом nAHP; (iv) обработанными агонистом после предварительной инкубации с антагонистом. АХ и

никотин использовались в качестве агонистов; СТХ, α -конотоксины МП и [A10L]PnIA в качестве антагонистов nAХР. Преинкубация клеток с антагонистом продолжалась 10 минут; обработка агонистом была от 30 с до 5 – 10 мин. После определения базового уровня интенсивности хемилюминесценции добавляли fMLF в концентрации 5 мкМ для инициации усиленной продукции АФК. Регистрация производилась последовательно со всех миникувет в течение 2,5 с и продолжалась в течение 10 – 30 мин. Общую продукцию АФК рассчитывали как площадь под кривой зависимости интенсивности хемилюминесценции от времени. Каждый независимый эксперимент проводился с клетками отдельного животного.

Анализ адгезии нейтрофилов

Образцы нейтрофилов (3×10^5 клеток), суспендированных в сбалансированном солевом растворе Хенкса (HBSS) с 1 мМ Ca^{2+} , инкубировали при 37°C в 96-луночном плоскодонном культуральном планшете (Corning, Нью-Йорк, США) с АХ, никотином (0,01 – 100 мкМ), СТХ (0,1–10 мкМ), α -конотоксином МП (0,001–0,1 мкМ) или смесью агонистов/антагонистов. В контрольных экспериментах инкубировали с HBSS. После инкубации в течение 60 мин супернатант удаляли и в каждую лунку добавляли 30 мкл этилового спирта (96%) для фиксации нейтрофилов. Этиловый спирт удаляли через 3 часа и планшет высушивали в течение 12 часов при 37°C. Прикрепленные клетки окрашивали красителем Романовского-Химса (1:10 PBS) в течение 40 минут, затем краситель удаляли и клетки трижды промывали PBS. Прикрепленные клетки ресуспендировали в изопропанол (99,5%, 250 мкл/лунка), затем измеряли оптическую плотность суспензии при 492 нм с помощью спектрофотометра Multiskan Plus (Labsystem, San-Diego, CA, USA). Уровень поглощения в экспериментальных лунках был нормализован на уровень того же параметра, измеренного в контрольных лунках.

Определение мутагенности Az

Мутагенность Az оценивалась по его способности индуцировать прямые мутации в гене гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (hprt) клеток яичника китайского хомячка CHO-k1. Клетки были приобретены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия). Клетки CHO-k1 культивировали в ростовой среде DMEM/F12 с высоким содержанием глюкозы, глутамина, не содержащей Na_2CO_3 , HEPES (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Мюнхен, Германия), с добавлением 10% FBS (BioSera, Франция), 0,1 М HEPES, 80 мг/мл гентамицина и 10 мг/мл флуконазола при

37°C, 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе. Перед обработкой Az клетки CHO-k1 пересевали и инкубировали в культуральной среде НАТ (5 мМ гипоксантин, 20 мМ аминоптерин и 0,8 мМ тимидин (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Мюнхен, Германия)) в течение трех дней, затем ростовую среду заменяли средой НТ (5 мМ гипоксантин и 0,8 мМ тимидин (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Мюнхен, Германия)) для дополнительной инкубации в течение одного дня. После этого клетки пересевали с плотностью 40000 клеток/см² в культуральные чашки Петри (диаметром 10 см).

На следующий день их обрабатывали в течение 4 часов различными концентрациями Az в диапазоне от 2,8 до 2000 мкг/мл при наличии или отсутствии системы метаболической активации (смесь S9 [505]). В качестве положительного контроля, были использованы два высокомуtagenных агента: этилнитрозмочевина (6,25 и 12,5 мкг/мл) и метилхолантрен (2,5 и 5 мкг/мл) при наличии или отсутствии системы метаболической активации (смесь S9), соответственно.

После обработки часть клеток CHO-k1 пересевали при плотности 150 – 500 клеток на 55 см² для определения цитотоксичности различных доз Az и контрольных веществ. Цитотоксичность веществ определяли по их относительной выживаемости после 7 дней культивирования по сравнению с контрольными необработанными клетками с использованием следующих формул:

$$\text{Цитотоксичность (\%)} = 100 - \frac{\text{Эффективность клонирования обработанного варианта}}{\text{Эффективность клонирования контроля культивирования}} \times 100$$

$$\text{Эффективность клонирования} = \frac{\text{количество колоний}}{\text{количество посаженных клеток}}$$

Остальные обработанные клетки CHO-k1 выращивали в ростовой среде в течение 8 дней, оптимального времени для выявления любых индуцированных мутаций гена hprt. Для определения частоты индуцированных мутаций клетки пересевали и растили в ростовой среде при наличии (2 000 000 клеток) или отсутствии (500 клеток) селективного агента 6-тиогуанина (2,2 мкг/мл) в течение 7 дней. После этого подсчитывали количество клеточных колоний в обеих средах и рассчитывали частоту мутаций по формуле:

$$\text{Частота мутаций} = \frac{\text{Эффективность клонирования мутантных колоний в селективной среде}}{\text{Эффективность клонирования в неселективной среде}}$$

4.2.4 Цито- и гистохимия

Цитохимический анализ жизнеспособности клеток

Для анализа жизнеспособности клетки линии Neuro2a спустя 48 – 72 часа после трансфекции инкубировали с 20 нМ раствором этилового эфира тетраметилпродамина (TMRE, Invitrogen, США) в течение 20 мин в темноте при комнатной температуре с последующей промывкой буфером, содержащим 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂, 2 мМ MgCl₂, 10 мМ HEPES, 10 мМ глюкоза, pH 7,4-7,5. Мертвые клетки идентифицировались в ходе окраски иодистым пропидием (50 нг/мл, BD Biosciences, США) в течение 5 мин, затем клетки также промывались этим буфером. Флуоресценция клеток после окраски детектировалась при помощи флуоресцентного микроскопа (Olympus, Япония), дальнейший анализ проходил с использованием программного обеспечения CellA (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Германия), CellX (Department of Biosystems Science and Engineering, Швейцария) и Image J (National Institutes of Health, США).

Цитохимия. Окраска клеток флуоресцентно-меченым α -бунгаротоксином

После однократной промывки клеток Neuro2a или HEK293T, экспрессирующими $\alpha 7$ или мышечный nAChR, буфером PBS проводили их фиксацию 4% раствором параформальдегида в течение 15 мин. Затем клетки трижды отмывали буфером PBS и инкубировали в растворе 0,5% Tween-20 и 1% БСА на основе PBS для пермеабиллизации и блокирования неспецифической сорбции токсина в течение 30 мин при комнатной температуре. После отбора пермеабиллизирующей смеси к клеткам добавляли 50 нМ флуоресцентно-меченый α -бунгаротоксин (Alexa Fluor 555- α Bgt, Alexa Fluor 488- α Bgt Invitrogen, США) для последующей инкубации в течение ночи при комнатной температуре. После интенсивной промывки буфером PBS, клетки заключали в 50%-ный раствор глицерина, приготовленный на основе 0,1 М натрий-фосфатного буфера, pH 8,3. В случае использования планшетов клетки оставляли в буфере PBS.

Преинкубация клеток со 100-кратным молярным избытком немеченого α -кобратоксина предотвращала их окрашивание с помощью Alexa Fluor 555- α Bgt, что служило доказательством специфичности связывания флуоресцентно-меченого токсина. Другим отрицательным контролем служило окрашивание клеток, трансфицированных смесью только двух плазмид, содержащих гены шаперона NACHO или Ric3 и кальциевого сенсора Case12. Связывание флуоресцентно-меченого α -бунгаротоксина с рецептором

детектировали с помощью флуоресцентного микроскопа IX71 (Olympus, Япония) с соответствующим набором светофильтров. Анализ флуоресценции клеток проводили с помощью программного обеспечения CellA (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Германия) и Image J (National Institutes of Health, США).

Цитохимия нейронов тройничного ганглия

После удаления ростовой среды клетки промывали буфером PBS и фиксировали в течение 20 мин в 4% растворе параформальдегида (Sigma-Aldrich, США). Затем их интенсивно промывали в фосфатном буфере (PBS, Sigma-Aldrich) и инкубировали в течение 1 ч в буфере PBS, содержащем 5% БСА и 0,5% Tween 20 для пермеабиллизации и блокирования неспецифической сорбции антител. Затем препараты инкубировали в течение 2 часов в PBS, содержащем 1% БСА и первичные антитела (мышинные антитела к NF-L (разведение 1:300, Invitrogen, США); кроличьи антитела к TRPV1(разведение 1:300, Alomone Labs, Израиль)). После интенсивной промывки в PBS срезы инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флуорофорами или биотином (Jackson ImmunoRes. Lab. Inc., США; Invitrogen, США), в течение двух часов при комнатной температуре. После интенсивной промывки в PBS клетки заключали с использованием aqua mount medium (Sigma, Германия), детекция проводилась с помощью микроскопа Olympus IX-70 (Токио, Япония) с соответствующим набором светофильтров и ПЗС-камерой.

Дегрануляция тучных клеток твердой мозговой оболочки

Для изучения влияния холинергических агентов на дегрануляцию тучных клеток использовали *ex vivo* препараты черепа крыс Вистар обоего пола (P9 – P13), предоставленные питомником Университета Восточной Финляндии. Непосредственно после проведения эвтаназии в CO₂ камере крыс декапитировали, череп отделяли и очищали от кожи и мышц. После этого череп разделяли на две половины и аккуратно извлекали оба полушария головного мозга, оставляя нетронутой твердую мозговую оболочку с сохранными системами иннервации. Контрольную половину черепа наполняли базовым солевым раствором (basic saline solution, BSS), содержащим (в миллимолях) 152 NaCl, 5 KCl, 10 HEPES, 10 глюкозы, 2,6 CaCl₂, 2,1 MgCl₂, pH 7,4, тогда как экспериментальную половину инкубировали с раствором карбахола (50 мкМ) или никотина (100 мкМ), приготовленных на основе BSS. Затем препараты фиксировали, для чего оставляли в 4%-ном растворе параформальдегида на 4 часа. После этого твердая

мозговая оболочка была механически отделена от черепа и в расплавленном состоянии помещена на предметное стекло микроскопа для последующего окрашивания 0,1% толуидиновым синим [506]. Дальнейший анализ и микрофотографирование проводили с помощью микроскопа Olympus AX70 (20×) в проходящем свете. Гомогенно окрашенные тучные клетки, имеющие четкие границы, были классифицированы как недегранулированные, тогда как бледные плохо окрашенные тучные клетки, а также тучные клетки с искаженными границами были классифицированы как дегранулированные. Для подсчета числа дегранулированных тучных клеток в каждом препарате случайно выбирались и фотографировались 10 независимых участков твердой мозговой оболочки [507].

Гистохимия *nervus spinosus* (ветви тройничного нерва)

В настоящем исследовании для проведения экспериментальных работ использовались самцы взрослых (P35 – P36) крыс линии Вистар, предоставленные питомником Университета Восточной Финляндии. Непосредственно после проведения эвтаназии в CO₂ камере крыс декапитировали, череп отделяли и очищали от кожи и мышц. После этого череп разделяли на две половины и аккуратно извлекали оба полушария головного мозга, оставляя нетронутой твердую мозговую оболочку с сохранными системами иннервации. После этого препарировали *nervus spinosus* (ветвь V3 ветви тройничного нерва) из обеих половин черепа и препараты нервов фиксировали в течение 3 – 4 ч в 4% растворе параформальдегида (Sigma-Aldrich, США). Затем их интенсивно промывали в фосфатном буфере (PBS, Sigma-Aldrich) и помещали в 18% раствор сахарозы на основе PBS для инкубации в течение ночи при 4°C. Поперечные срезы *nervus spinosus* (8 мкм), полученные с помощью криостата Leica (Германия), инкубировали в течение 1 ч в буфере PBS, содержащем 5% БСА и 0,5% Tween 20 для пермеабелизации и блокирования неспецифической сорбции антител. Затем препараты инкубировали в течение ночи при 4°C в PBS, содержащем 1% БСА и первичные антитела (кроличьи антитела к MBP (разведение 1:300, Abcam, Великобритания); мышинные антитела к NF-L (разведение 1:300, Invitrogen, США); кроличьи антитела к TRPV1 (разведение 1:300, Alomone Labs, Израиль)). После интенсивной промывки в PBS срезы инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флуорофорами или биотином (Jackson Immunog. Lab. Inc., США; Invitrogen, США), в течение двух часов при комнатной температуре. После интенсивной промывки в PBS срезы нервов заключали с использованием aqua mount medium (Sigma, Германия), детекция проводилась с помощью

микроскопа Olympus IX-70 (Токио, Япония) с соответствующим набором светофильтров и ПЗС-камерой.

Иммуногистохимическое окрашивание ацетилхолинэстеразы (AChE) и бутирилхолинэстеразы (BuChE) в препаратах твердой мозговой оболочки

В настоящем исследовании для проведения экспериментальных работ использовались самцы взрослых (P35 – P36) крыс линии Вистар, предоставленные питомником Университета Восточной Финляндии. Непосредственно после проведения эвтаназии в CO₂ камере крыс декапитировали, череп отделяли и очищали от кожи и мышц. После этого череп разделяли на две половины и аккуратно извлекали оба полушария головного мозга, оставляя нетронутой твердую мозговую оболочку с сохранными системами иннервации. Твердую мозговую оболочку механически отделяли от черепа крыс и фиксировали в течение 60 мин в 2% растворе параформальдегида (Sigma-Aldrich, США), после чего трижды промывали в течение 30 мин в фосфатном буфере (PBS, Sigma-Aldrich). Затем препараты последовательно инкубировали в течение 30 мин в 0,3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), в течение 15 мин в растворе, содержащем 5% козьей сыворотки (Sigma-Aldrich), 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА, Sigma-Aldrich) и 0,3% Тритон X-100 и в течение 15 мин в растворе 1% БСА и 0,3% Тритона X-100 (раствор А). Все растворы были приготовлены с использованием PBS.

Затем препараты инкубировали в течение 15 ч при 4°C в растворе А, содержащем козы поликлональные антитела к AChE (разведение 1:1000, Santa Cruz Biotechnologies, США) или мышинные моноклональные антитела к BuChE (разведение 1:1000), а также кроличьи поликлональные антитела к нейрофиламентам NF-H (1:1000, Santa Cruz Biotechnologies, США). Препараты трижды промывали в растворе А и затем инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре с соответствующими вторичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488 или 647 (Invitrogen, США), разведенными 1:1000 в растворе А. После промывки в PBS препараты помещали в раствор глицерина в PBS (1: 1) и анализировали окрашенные структуры с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Zeiss LSM 510 Meta (Карл Цейсс, Германия) (63×, масляная иммерсия, NA = 1,4).

Гистохимическое окрашивание срезов спинномозговых ганглиев

Гистохимическая процедура была основана на протоколе, опубликованном ранее [508], с внесением некоторых изменений. Срезы (10 мкм толщиной) нарезали на криостате

из замороженных образцов тканей крыс. Срезы из свежезамороженной ткани фиксировали изопропанолом при 4°C или 4%-ным раствором параформальдегида при 21°C в течение 10 мин, после чего промывали PBS, дистиллированной водой и высушивали на воздухе в течение 1 ч. Срезы из предварительно фиксированной ткани сразу высушивали на воздухе в течение 1 ч. Затем наносили на 1 ч раствор, содержащий 10% нормальной лошадиной сыворотки, 1% БСА, 0,5% Твин-20 в PBS, для блокирования неспецифической сорбции. После отбора блокирующего раствора срезы преинкубировали в течение 1–2 ч с буфером А (1% БСА, 150 мМ NaCl в PBS). К контрольным образцам в буфер А добавлялся стократный молярный избыток немеченого СТХ или NTH. Затем вносили раствор антител и/или Alexa- α Bgt в конечной концентрации, указанной в таблице 4.5, и инкубировали срезы в течение ночи (использовалась 12,5 – 25 нМ концентрация Alexa- α Bgt). Для выявления связавшихся антител использовали подходящие вторичные реагенты (Таблица 4.5). Ядра клеток окрашивали DAPI (1:1000) в течение 20 мин. После промывки PBS срезы инкубировали с 4%-ным раствором параформальдегида при 21°C в течение 10 мин, отмывали еще раз и заключали в 50% глицерин (рН 8,6). Микрофотографии срезов были получены с использованием эпифлуоресцентного микроскопа («AxioPlan2», «Zeiss», Германия) с использованием соответствующих комбинаций светофильтров. Преинкубация поликлональных кроличьих антител к CGRP (Таблица 4.5) с соответствующим пептидом (Acris Antibodies GmbH, Germany) (1 мкг пептида на 50 мкл антител (1:3200)) или исключение этапа инкубации с первичными антителами приводили к отсутствию окрашивания. Замена козьих антител к CGRP кроличьими антителами к тому же пептиду дала такое же типичное точечное окрашивание перинуклеарной области [509, 510] и тот же процент совместной локализации с Alexa- α Bgt.

Анализ распределения клеток по диаметру и процент гистохимически определенных популяций нейронов был выполнен для нейронов, содержащих ядро, визуализированное с помощью DAPI-мечения. Средний диаметр клеток измеряли как среднее по самой короткой и самой длинной осям сечения нейрона. Данные, полученные для поясничных и грудных спинномозговых ганглиев были объединены, так как не было значительных различий в распределении по размеру нейронов для обеих популяций (критерий Колмогорова-Смирнова, $p > 0,2$).

Таблица 4.5. Первичные антитела и вторичные реагенты.

Первичные антитела	Животные	Концентрация	Источник
CGRP	коза	1:4000	Biotrend, Германия
CGRP	кролик	1:3200	Peninsula Laboratories, США
MBP	овца	1:2000	Chemicon, США
NF-L	мышь	1:600	Invitrogen, США
NF200	кролик	1:600	Sigma-Aldrich, Германия
PGP 9.5	кролик	1:5000	Biotrend, Германия
TH	кролик	1:400	Biotrend, Германия
TRPV1	кролик	1:2000	Chemicon, США

Реагенты	Конъюгаты	Животные	Концентрация	Источник
Anti-goat IgG	Texas Red	осел	1:400	Dianova, Германия
Anti-rabbit IgG	Biotin	осел	1:200	Amersham, Великобритания
Anti-sheep IgG	Biotin	осел	1:400	Amersham, Великобритания
Streptavidin	AMCA		1:200	Dianova, Германия

Иммуногистохимическое окрашивание $\alpha 7$ nAHP в мозге грызунов

Крысы линии Вистар (n=17) и GAD67-GFP (Днео) мыши (n=9) были глубоко анестезированы внутривенной инъекцией уретана (12 г/кг) или Сагатала (пентобарбитал натрия, 100 мг/кг, Rhône Mérieux Ltd., Харлоу, Эссекс, Великобритания). После потери всех подошвенных рефлексов и рефлексов роговицы глаза животных перфузировали транскардиально с использованием 4%-ного раствора параформальдегида на основе 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,4). Головной мозг выделяли и помещали в тот же раствор для последующей фиксации на 1 – 2 ч, а затем в 0,1 М фосфатный буфер на ночь при 4°C. Вибратомные срезы головного мозга толщиной 50 мкм были нарезаны с помощью вибратора LeicaVT1000S (Leica, Микро-системы UK, MiltonKeynes, UK) во фронтальной плоскости и промыты PBS, pH 7,4. Срезы инкубировали в 50%-ном этаноле в течение 30 мин, затем блокировали неспецифическую сорбцию антител за счет 1-часовой инкубации в 2%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА). В этом же растворе проводили инкубацию с первичными антителами в течение ночи при комнатной температуре или до трех суток при 4°C. Следующие первичные антитела использовались: козы антитела к даблкортину (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Хайдельберг, Германия), мышинные антитела к NeuN (1:1000, Chemicon, Millipore, Уотфорд, Великобритания) и кроличьи антитела к фрагменту 8–25 $\alpha 7$ субъединицы nAHP (1:1500

[498, 511]). После трех промывок срезы инкубировали в течение 2 часов с соответствующими комбинациями ослиных вторичных антител, конъюгированных с Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 555 или Alexa Fluor 488 (1:1000, Invitrogen Life Technologies, Пейсли, Великобритания). Затем срезы промывали и помещали на предметные стекла Polysine (Fisher Scientific UK Ltd., Лафборо, Великобритания) в гистологической среде Vectorshield mounting medium с добавлением или без добавления DAPI для окраски ядер клеток (Vector Laboratories, США).

Просмотр изображений и микрофотографирование случайно выбранных полей в rostro-каудальном направлении зубчатой фасции проводили с использованием конфокального микроскопа Zeiss LSM 510 (Цейсс, Великобритания), оснащенного гелий-неоновым, аргоновым и диодным 405 нм лазерами. Подсчет и измерение клеток проводили с использованием программного обеспечения Zeiss LSM Image Browser. Для измерения интенсивности свечения использовали программное обеспечение ImageJ (1.43N, Уэйн Расбанд, Национальный институт здравоохранения, США).

Гистохимическое окрашивание $\alpha 7$ nAChR в мозге грызунов с помощью флуоресцентного α Bgt

Методика была основана на протоколах, опубликованных ранее [508, 512]. Крысы линии Вистар (P21, n=4) были глубоко анестезированы внутривенной инъекцией Сагатала (пентобарбитала натрия, 100 мг/кг, Rhône Mérieux Ltd., Харлоу, Эссекс, Великобритания). После потери всех подошвенных рефлексов и рефлексов роговицы глаза животных перфузировали транскардиально с использованием 5%-ного холодного раствора сахарозы в буфере ТВА, содержащем (в мМ) Трис 50; NaCl 120, KCl 5, CaCl₂ 2,5; MgCl₂ 1, pH 7,4. Замороженные образцы ткани головного мозга были нарезаны на срезы толщиной 20 мкм в горизонтальной плоскости гиппокампа с использованием криостата Leica. Срезы помещали на предметные стекла Polysine (Fisher Scientific UK Ltd., Лафборо, Великобритания) и хранили при -80°C до проведения дальнейших процедур. Все растворы готовили на основе ТВА, содержащем 0,1% Тритон X-100. Срезы фиксировали в изопропиловый спирт в течение 10 мин при 4°C, а затем инкубировали в 1% БСА в ТВА в течение 30 минут для блокирования неспецифической сорбции реагентов. Затем наносили раствор 50 нМ биотинилированного α -бунгаротоксина (Invitrogen, Пейсли, Великобритания) в 1%-ном растворе БСА в ТВА, с которым инкубировали препараты в течение ночи при 4°C. Контрольные препараты инкубировали в том же растворе с добавлением избытка никотина (1 мМ) или α -кобратоксина (10 мкМ). После пятикратной

промывки в ТВА срезы инкубировали со стрептавидином, конъюгированным с Alexa Fluor 594 или 488, в 1%-ном растворе БСА в ТВА при комнатной температуре в течение часа. Затем срезы промывали и заключали в гистологическую среду Vectorshield mounting medium (Vector Laboratories, США).

Просмотр изображений и микрофотографирование случайно выбранных полей в rostro-каудальном направлении зубчатой фасции проводились с использованием конфокального микроскопа Zeiss LSM 510 (Цейсс, Великобритания), оснащенного гелий-неоновым, аргоновым и диодным 405 нм лазерами. Подсчет и измерение клеток проводили с использованием программного обеспечения Zeiss LSM Image Browser. Для измерения интенсивности свечения использовали программное обеспечение ImageJ (1.43N, Уэйн Расбанд, Национальный институт здравоохранения, США).

4.2.5 Кальциевый имиджинг

Кальциевый имиджинг отдельных клеток Neuro2a

Для изучения изменений цитоплазматической концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]_i$) стекло с трансфицированными клетками Neuro2a помещали в регистрационную камеру, перфузируемую буфером, содержащим 140 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 2,8 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, 10 mM глюкозы; pH 7,4. Для детекции флуоресценции кальциевого сенсора Case12 (Евроген, Россия, длина волны возбуждения равна 491 нм, длина волны эмиссии – 516 нм), экспрессируемого в клетках линии Neuro2a, использовался флуоресцентный микроскоп IX71 (Olympus, Япония) с соответствующим набором светофильтров и объективом с увеличением 20X и видеокамера CAM-XM10 (Olympus, Japan). Обработка видеозаписей и последующий анализ данных проводились с использованием программ ImageJ (National Institutes of Health, США), OriginPro 2017 (OriginLab Corporation, США) и Microsoft Office Excel (Microsoft, США).

Последовательность стадий кальциевого имиджинга $\alpha 7$ nAHP включала стадию преинкубации (1 мин) с раствором PNU-120596 в концентрации 10 мкМ (Tocris, Великобритания); затем стадию добавления агониста (15 сек), растворы агониста также содержали 10 мкМ PNU-120596; и, наконец, стадию отмыва 5 мл наружного электрофизиологического раствора (10-15 мин). В случае рецептора мышечного типа позитивный аллостерический модулятор PNU-120596 не использовался. Преинкубация клеток с 3 мкМ раствором α -кобратоксина подавляла действие тестируемых агонистов, подтверждая их специфическое связывание с $\alpha 7$ или $\alpha 1\beta 1\epsilon \delta$ nAHP.

Кальциевый имиджинг популяции клеток Neuro2a

Во всех лунках 96-луночного планшета с трансфицированной клеточной культурой проводили замену ростовой среды на буфер, содержащий 140 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂, 2,8 мМ KCl, 4 мМ MgCl₂, 20 мМ HEPES, 10 мМ глюкозы; pH 7,4. Клетки, экспрессирующие белковый кальциевый сенсор Case12 сразу подвергали действию лигандов nAHP, клетки без кальциевого сенсора инкубировали в том же буфере, содержащем 0.92 мМ низкомолекулярного кальциевого индикатора Fluo-4 и 1,25 мМ пробенецида (Thermo Fisher Scientific, США) в темноте в течении 30 мин при 37 °С, а затем еще 30 мин при комнатной температуре.

Последовательность стадий кальциевого имиджинга $\alpha 7$ рецептора и его мутантных форм включала стадию преинкубации (20 мин) с раствором PNU-120596 в концентрации 10 мкМ (Tocris, Великобритания); затем стадию добавления агониста, растворы агониста также содержали 10 мкМ PNU-120596. В случае рецептора мышечного типа позитивный аллостерический модулятор PNU-120596 не использовался. Преинкубация клеток с 3 мкМ раствором α -кобратоксина подавляла действие тестируемых агонистов, подтверждая их специфическое связывание с $\alpha 7$ или $\alpha 1\beta 1\epsilon \delta$ nAHP. При изучении действия антагонистов или модуляторов использовался преинкубационный раствор, содержащий лиганд в определенной концентрации, также антагонисты могут подаваться наряду с добавлением агониста, минуя стадию преинкубации.

Изменения флуоресценции сенсора детектировались с помощью микропланшетного флуориметра *Hidex Sense Microplate Reader* (Hidex, Финляндия) в режиме Kinetics GFP ($\lambda_{ex/em} = 485/535 \pm 10$ нм), число циклов измерения составляло 80, время одного цикла – 2 сек. Анализ изменений интенсивности флуоресценции проводили с использованием программ OriginPro 2017 (OriginLab Corporation, США) и Microsoft Office Excel (Microsoft, США).

Кальциевый имиджинг нейронов тройничного ганглия

Перед проведением экспериментов первичную культуру клеток тройничного ганглия промывали буфером, содержащим (в миллимолях) 152 NaCl, 2,5 KCl, 10 HEPES, 10 глюкозы, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, pH 7,4. Затем клетки наполняли кальциевым индикатором Флуо-3 (2 мкМ ацетоксиметилловый эфир флуо-3 (Invitrogen, США)) при 37°C в течение 45 мин в том же буфере. Через 20 минут после инкубации стекла были перенесены в систему регистрации TILL Photonics (TILL Photonics GmbH, Мюнхен, Германия), куда постоянно подавался тот же буфер со скоростью 1,2 мл/мин. Установка для проведения кальциевого

имиджинга была оборудована быстрой перфузионной системой (Rapid Solution Changer RSC-200, BioLogic Science Instruments, Гренобль, Франция), что позволяло быстро (время обмена ~ 30 мс) добавлять исследуемые вещества к клеткам. Регистрация изменений внутриклеточной концентрации ионов кальция в ответ на добавление различных соединений проводилась с помощью микроскопа Olympus IX-70 (Токио, Япония) с $10\times$ объективом при $\lambda = 488$ нм. Микрофотографирование проводилось с помощью ПЗС-камеры (SensiCam, PCO Imaging, Кельхайм, Германия) с частотой 2 кадра/с.

Кальциевый имиджинг нейронов спинномозговых ганглиев

Измерения внутриклеточной концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]_i$) проводили в первичных культурах нейронов спинномозговых ганглиев. Измерения проводились при постоянной температуре $34-36^\circ C$ в насыщенном кислородом буфере Locke (pH 7,4), содержащем (в мМ): $NaHCO_3$ 14,3, NaH_2PO_4 1,2, KCl 5,6, NaCl 136, $MgCl_2$ 1,2, $CaCl_2$ 2,2 и D-глюкозу 10. Клетки инкубировали в течение 30 минут с раствором индикатора ионов кальция (4 мкМ Fura-2 AM (Invitrogen, США) в среде L-15, содержащей 20% FBS), затем покровное стекло помещали в регистрационную камеру объемом 2 мл и промывали в течение 20 минут, подавая буфер Locke. Возбуждение флуоресцентного кальциевого индикатора Fura-2 проводилось при 340 и 380 нм (λ), а флуоресценция регистрировалась при $\lambda > 420$ нм. Кальциевые ответы каждого нейрона оценивались независимо, изменения были нормализованы по отношению к первоначальному базовому уровню флуоресценции клетки. В каждом эксперименте клетки подвергали воздействию агониста нАХР эпибатидина (10^{-5} М) или PNU282987 (10^{-6} М) с последующим применением капсаицина (0,5 мкМ) и KCl (50 мМ) после периода отмывки клеток. В некоторых экспериментах клетки перед добавлением агонистов пренкубировали с положительным аллостерическим модулятором нАХР PNU120596 (10^{-6} М) или антагонистами СТХ ($10^{-6}-10^{-7}$ М, Таблица 4.2), мекамиламином (10^{-5} М).

Кальциевый имиджинг популяции нейтрофилов

Измерение цитоплазматической концентрации Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) в нейтрофилах проводили с использованием низкомолекулярного флуоресцентного кальциевого индикатора Fura-2AM. Суспензия нейтрофилов (5×10^6 клеток/мл) инкубировалась с 5 мкМ Fura-2AM в сбалансированном солевом растворе Хенкса (HBSS) в течение 40 минут при $37^\circ C$. Затем клетки дважды промывали и ресуспендировали в HBSS. Клетки инкубировали в течение некоторого времени на льду, затем 100 мкл клеточной суспензии

помещали на 25 мм круглые покровные стекла и оставляли для прикрепления клеток на 10 мин. После отмыва неприкрепленных клеток покровные стекла были установлены в экспериментальной перфузируемой камере объемом 500 мкл. Клетки визуализировали с использованием CellObserver imaging system (Carl Zeiss, Германия) на основе микроскопа Axiovert 200 M, оснащенного системой быстрого переключения фильтров возбуждения Ludl MAC5000. Для возбуждения флуоресцентного индикатора Fura-2 в состоянии, связанном с ионами Ca^{2+} , и в свободном состоянии использовали светофильтры BP 340/30 и BP 387/15, соответственно. Флуоресценцию детектировали при 530 ± 25 нм. Никотин в диапазоне концентраций от 0,01 до 10 мкМ наносили на клетки после обработки или без обработки карамифеном (1 или 10 мкМ). Анализ изображений проводили с использованием программного обеспечения ImageJ (Национальный институт здравоохранения США, Бетесда, Мэриленд, США). Изменения в $[\text{Ca}^{2+}]_i$ представлены как соотношение интенсивности флуоресценции после возбуждения при 340/380 нм за вычетом фонового уровня [513]. Рассчитывался процент клеток, реагирующих на добавление никотина, а также средняя интенсивность кальциевого сигнала от 100 до 500 клеток в каждом образце.

4.2.6 Электрофизиология

Электрофизиологические измерения в ооцитах *Xenopus laevis*

Водные растворы плазмидных ДНК, содержащих гены субъединиц nAХР крысы ($\alpha 4$ -pcDNA3.1 и $\beta 2$ -pcDNA3.1 в соотношении 1:1), химерного рецептора ($\alpha 7$ /Gly-pMT3), а также ГАМК_A-рецептора мыши ($\alpha 1$ -pCI, $\alpha 2$ -pCI, $\alpha 3$ -pCI, $\beta 2$ -pCI, $\beta 3$ -pCI, $\gamma 2$ -pCI, δ -pCI) инъецировались в районе анимального полюса ооцита при помощи вакуумного наноинжектора NanoJect-2 (“Drummond”, Германия) в количестве 2,3 нг (23 нл раствора плазмид с концентрацией 100 нг/мкл). Водные растворы мРНК, содержащие гены субъединиц nAХР человека ($\alpha 3$ и $\beta 2$ (в соотношении 1:1), $\alpha 4$ и $\beta 2$ (в соотношении 1:1) и $\alpha 9$ и $\alpha 10$ (в соотношении 1:1)), а также $\alpha 7$ субъединицы nAХР и субъединицы 5-НТ3А рецептора серотонина мыши инъецировались в ооцит в количестве 9,2 нг (23 нл раствора мРНК с концентрацией 400 нг/мкл). Перед электрофизиологическими измерениями инъецированные ооциты содержались в буфере Barth для инкубации ооцитов, дополнительно содержащем 40 мкг/мл гентамицина и 100 мкг/мл ампициллина, в течение 48-120 часов при постоянной температуре +18°C, а в некоторых случаях

дополнительно выдерживались при +4°C в течение следующих 24 часов. Смена буфера осуществлялась каждые 24 часа.

В некоторых экспериментах буфер Barth был заменен на буфер ND96, дополнительно содержащий ампициллин и канамицин.

Измерения проводились при помощи дифференциального усилителя TURBO TEC-03X (pri electronic GmbH, Drummond, Германия) и программного обеспечения WinWSP (Университет Стратклайда, Великобритания) методом двухэлектродной фиксации потенциала (TEVC, two-electrode voltage clamp) при мембранном потенциале -60 мВ, задаваемом токовым микроэлектродом. Объем регистрационной камеры составлял 50 мкл. Растворы лигандов различных концентраций готовились на основе буфера Barth, ND96 или буфера NFR, содержащего 90 мМ NaCl, 1 мМ KCl, 1,5 мМ BaCl₂, 10 мМ HEPES, pH 7.2. Тестировании соединений, действующих на $\alpha 9\alpha 10$ nAHP, проводилось в буфере, не содержащем ионы кальция, в данной работе был использован Ba²⁺ Ringer's solution: 115 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 1,8 мМ BaCl₂, 10 мМ HEPES; pH 7.2.

Объем раствора лиганда составлял 100 мкл, промывка ооцита буфером (от 1000 мкл) происходила в течение 5 мин между добавлением лигандов. В экспериментах по тестированию действия антагонистов и модуляторов проводилась стадия преинкубации (5 мин), в течение которой ооциты преинкубировали с исследуемым лигандом, после чего добавляли этот лиганд совместно с агонистом (3с).

Электрофизиологические измерения в клетках линии мышинной нейробластомы Neuro2a

Стекло с трансфицированными клетками Neuro2a с экспрессией $\alpha 7$ nAHP помещали в регистрационную камеру инвертированного микроскопа Olympus, перфузируемую буфером следующего состава: 20 мМ HEPES, 140 мМ NaCl, 2,8 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ глюкозы; pH 7,4. Ионные токи, генерируемые целой клеткой, регистрировали с помощью усилителя НЕКА (НЕКА Elektronik, Германия) в режиме пэтч-клампа; к клетке подводилась микропипетка из боросиликатного стекла (Гарвард Аппарат, США), заполненная буфером, содержащим 140 мМ CsCl, 6 мМ CaCl₂, 2 мМ MgCl₂, 2 мМ MgATФ, 0,4 мМ NaГТФ, 10 мМ HEPES/CsOH, 20 мМ ВАРТА/КОН; pH 7,3) Во время эксперимента ацетилхолин в концентрациях от 1 до 100 мкМ (совместно с PNU120596 (10 мкМ, Tocris, Великобритания)) подавался к клетке с помощью перфузионной системы Fast-Step (1 мл/мин, Warner Instruments, США). Электрофизиологические записи были выполнены при потенциале -40 мВ. Для записи и

анализа ионных токов использовали программное обеспечение Patchmaster (НЕКА Elektronik, Германия) и OriginPro 9.1 (Microcal, Нортгемптон, Массачусетс, США).

Электрофизиология *nervus spinosus* (ветви тройничного нерва)

Подробно приготовление *ex vivo* препарата, состоящего из половины черепа крысы с интактной твердой мозговой оболочкой и сохранными системами иннервации, было описано ранее [514]. В настоящем исследовании для проведения экспериментальных работ использовались самцы взрослых (P35 – P36) крыс линии Вистар, предоставленные питомником Университета Восточной Финляндии. Непосредственно после проведения эвтаназии в CO₂ камере крыс декапитировали, череп отделяли и очищали от кожи и мышц. После этого череп разделяли на две половины и аккуратно извлекали оба полушария головного мозга, оставляя нетронутой твердую мозговую оболочку с сохранными системами иннервации. Половину черепа помещали в электрофизиологическую камеру и перфузировали со скоростью 6 – 7 мл/мин оксигенированным (5% CO₂/95% O₂) раствором искусственной спинномозговой жидкости (ACSF), содержащим (в миллимолях): NaCl 120, KCl 3, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, NaH₂PO₄ 1, NaHCO₃ 25 и глюкозу 10, pH 7,3. Часть *nervus spinosus* (небольшая ветвь тройничного нерва) [515], иннервирующая мозговые оболочки, отсекалась и помещалась в стеклянный микроэлектрод, наполненный ACSF, для проведения записи спонтанной нервной активности. Для изучения влияния определенных веществ на спонтанную электрическую активность *nervus spinosus*, их оксигенированные растворы в ACSF подавались в электрофизиологическую камеру с аналогичной скоростью 6 – 7 мл/мин в течение 10 – 20 мин. Цифровой усилитель ISO 80 (WPI Inc., Сарасота, Флорида, США) и программное обеспечение WinEDR V3.4.6 (Университет Стратклайда, Глазго, Великобритания) использовали для проведения записи и анализа электрофизиологической активности *nervus spinosus*. Измерения проводились при комнатной температуре. Частота генерируемых потенциалов действия оценивалась и анализировалась с использованием программного обеспечения OriginPro 9.1 (Microcal, Нортгемптон, Массачусетс, США). Базовая частота потенциалов действия оценивалась в течение 10 минут, предшествующих подаче исследуемых веществ.

Электрофизиология нервных клеток на срезах мозга грызунов

Электрофизиологические измерения проводились для детекции функциональных ответов $\alpha 7$ nAHP нервных клеток зубчатой фасции гиппокампа. Крысы линии Вистар

(n=24) и GAD67-GFP (Днео) мыши (n=55) были глубоко анестезированы внутривентриальной инъекцией Сагатала (пентобарбитал натрия, 100 мг/кг, Rhône Mérieux Ltd., Харлоу, Эссекс, Великобритания). После потери всех подошвенных рефлексов и рефлексов роговицы глаза животных перфузировали транскардиально с использованием охлажденной и насыщенной кислородом искусственной цереброспинальной жидкости (artificial cerebrospinal fluid, aCSF), где хлорид натрия был заменен сахарозой (в мМ): 225 сахарозы, 3 KCl, 6 MgSO₄, 0,5 CaCl₂, 1,25 NaH₂PO₄, 24 NaHCO₃ и 10 глюкозы. Этот же раствор использовался для приготовления срезов головного мозга мышей (300 мкм толщиной) и крыс (350 мкм толщиной) с помощью вибратора Leica VT1000S (Leica Microsystems UK, Милтон Кейнс, Великобритания).

Электрофизиологические ответы целых клеток регистрировали по протоколу, описанному ранее [516]. Срезы инкубировали в течение часа при комнатной температуре в регистрационной камере, наполненной искусственной цереброспинальной жидкостью (ACSF) с постоянной подачей карбогена (95% O₂–5% CO₂), где поддерживалась температура 34°C и постоянная скорость потока 2,1 мл/мин. ACSF содержала (в мМ): 126 NaCl, 3 KCl, 2 MgSO₄, 2 CaCl₂, 1,25 NaH₂PO₄, 24 NaHCO₃ и 10 глюкозы. Электрофизиологические ответы целых клеток регистрировали с использованием стеклянных микропипеток (сопротивление 4 – 6 МОм), которые были наполнены раствором, содержащим (мМ): 140 глюконата калия; 5 KCl; 2 MgCl₂; 10 HEPES; 0,1 ЭГТА; 0,025 CaCl₂; 2 АТФ-Na; 0,4 ГТФ-Na (pH 7,35). Бицитин (0,5 мг) смешивали с 1 мл этого раствора непосредственно перед записью токов. Регистрацию ионных токов проводили с использованием AxoClamp 2B усилителя (Axon Instruments Inc., Калифорния, США), тела клеток идентифицировали с помощью инфракрасной дифференциально-интерференционной контрастной видео-микроскопии (микроскоп Zeiss Axioscope, ПЗС-камера Hamamatsu, электрофизиологическая установка Luigs and Neumann Infrapatch, Ратинген, Германия).

Ионные токи, опосредованные активацией nAHP, регистрировали при значении потенциала – 60 мВ. АХ (3 мМ в HEPES-содержащей aCSF (в мМ: 146 NaCl; 10 HEPES; 2,5 KCl; 2 CaCl₂; 2 MgCl₂; 5 глюкозы, pH 7,3)) подавался к клетке с помощью стеклянной микропипетки с использованием PicoPump (World Precision Instruments, Хартфордшир, Великобритания) как описано ранее [517]. Все остальные вещества подавались непосредственно в раствор регистрационной камеры. АХ подавался каждые 180 с (на 5-15 мс), сначала без атропина, а затем совместно с 5 мкМ раствором атропина.

Чтобы идентифицировать заполненные биоцитином клетки, срезы после электрофизиологических измерений фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида в 0,1 М фосфатном буфере в течение ночи, после чего интенсивно промывали и оставляли для дальнейшей промывки в том же буфере на ночь. Срезы заключали в 10%-ный раствор желатина в 0,1 М фосфатном буфере при нагреве до 40°C в течение 30 мин. Затем из полученных препаратов нарезали срезы толщиной 75 мкм, используя вибратор Leica VT1000S, промывали в PBS и затем инкубировали с раствором флуоресцентно-меченого стрептавидина (1:1000, Texas Red-стрептавидин, Invitrogen, США) в течение 2 ч.

4.2.7 Радиолигандный анализ

Радиолигандный анализ препаратов мембран мозга мышей

Для оценки количества участков связывания α -бунгаротоксина или α -конотоксина МПУ⁰ препараты мембран (50 мкг белка) инкубировали с 1 нМ ¹²⁵I- α Bgt (“GE Healthcare”, Великобритания) или 0,6 нМ ¹²⁵I-МПУ⁰ (удельная активность 2000 Ки/ммоль) в 50 мкл буфера для связывания: 50 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl (pH 8,0), содержащего 0,1% БСА (вес/объём), 5 мМ ЭДТА и коктейль ингибиторов протеаз. После инкубации в течение 2 ч при комнатной температуре связывание останавливали фильтрацией через фильтры Whatman GF/F, выдержанные в 0,5% полиэтиленимине. Фильтры промывали холодным 50 мМ Трис-НСl (pH 8,0) и связавшуюся радиоактивность определяли на γ -счетчике Wallac 1470 WIZARD® Gamma Counter (“PerkinElmer”, США). Для определения количества сайтов связывания эпibatидина образцы (50 мкг белка) инкубировали с 2 нМ ³H-эпibatидина (30–60 Ки/ммоль, “PerkinElmer Life Sciences”, США) в 125 мкл буфера для связывания (144 мМ NaCl, 1,5 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂, 50 мМ Трис-НСl, 0,1% БСА, 1 мМ PMSF, pH 7,5) в течение 3 ч. После фильтрования фильтры промывали холодным 50 мМ Трис-НСl (pH 8,0), высушивали, помещали во флаконы со сцинтиллятором и просчитывали количество связавшегося ³H-эпibatидина в жидкостном сцинтилляционном счетчике Tri-carb 2100TR (“Packard”, США). Неспецифическую сорбцию ³H-эпibatидина, ¹²⁵I-МПУ⁰ или ¹²⁵I- α Bgt определяли в присутствии 1 мкМ никотина, МПУ⁰ или α -кобротоксина, соответственно. Все измерения были выполнены в 3-5 повторах.

Конкурентный радиолигандный анализ

В конкурентном радиолигандном анализе оценивалась способность исследуемых низкомолекулярных соединений и пептидов конкурировать с радиоактивно меченым α -

бунгаротоксином ($[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{Bgt}$) за связывание с ортостерическими участками АХСБ или нАХР. Набор различных концентраций исследуемых веществ преинкубировали в течение 2 – 3 ч при комнатной температуре в буфере для связывания (20 мМ Трис-НСl, 1 мг/мл БСА, рН 8,0, объем 50 мкл) с препаратами рецепторов и АХСБ: АХСБ *Aplysia californica* (в конечной концентрации 140 нМ, предоставлен проф. Смит А.Б., Университет Амстердама, Нидерланды), мембранами электрического органа ската *Torpedo californica*, содержащими $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$ нАХР мышечного типа (с конечной концентрацией токсин-связывающих сайтов 1,25 нМ, препарат предоставлен проф. Хухо Ф., Свободный университет Берлина, Германия) или с клетками линии GH_4C_1 , экспрессирующими нейрональный $\alpha 7$ нАХР человека (6,5 мкг белка, конечная концентрация токсин-связывающих сайтов равна 0,4 нМ, суспензия мертвых клеток предоставлена компанией EliLilly, Великобритания). Затем к образцам добавляли $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{Bgt}$ в конечной концентрации 0,1 – 0,2 нМ для инкубации в течение 5 мин. Процесс удаления несвязавшегося $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{Bgt}$ осуществляли за счет быстрой фильтрации реакционной смеси через GF/C фильтры (Whatman, Великобритания) с последующей трехкратной промывкой буфером для связывания (по 3 мл буфера). Используемые фильтры предварительно обрабатывали 0,25% полиэтиленимином. В качестве контрольного эксперимента служил аналогичный опыт с преинкубацией в течение 2 – 3 ч препаратов АХСБ или нАХР с 30 мкМ раствором α -кобратокина (СТХ). Количественные измерения связавшегося $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{Bgt}$ проводили с использованием γ -счетчика Wallac Wizard 1470 (GMI Inc., США). Результаты анализировали с получением параметров взаимодействия исследуемых соединений с соответствующими мишенями (в виде значений IC_{50}) при помощи программы OriginPro 9.1 (Microcal, Нортгемптон, Массачусетс, США).

4.2.8 In silico методы

Молекулярное моделирование внеклеточного домена ГАМК_A-рецептора

Внеклеточные домены $\alpha 1$ и $\beta 3$ субъединиц, формирующих $\beta 3+\alpha 1$ -связывающую поверхность ГАМК_A-рецептора, где расположен ортостерический сайт связывания лигандов, были смоделированы на основе недавно опубликованной кристаллической структуры $\beta 3$ -гомопентамера (2). Внеклеточный домен $\alpha 1$ субъединицы был сконструирован используя швейцарский сервис для гомологичного моделирования (Swiss model homology modeling service 31). Внеклеточный домен ГАМК_A-рецептора в некоторой степени гомологичен ацетилхолин-связывающему белку (АХСБ) *Lymnaea stagnalis*. Предполагая, что СТХ связывается с ортостерическим сайтом ГАМК_A-рецептора

аналогично его положению в кристаллическом комплексе с АХСБ, была построена модель его взаимодействия с данным рецептором путем выравнивания β 3-субъединичного внеклеточного домена с основным протомером АХСБ, а α 1 – с комплементарным протомером, исходя из кристаллической структуры АХСБ с СТХ (PDB 1YI5). Для этого использовалась UCSF Chimera (32). Для результирующих структур было найдено наиболее энергетически выгодное состояние с помощью GROMACS 5.0 (33). Для симуляции 100 нс поведения комплекса проводились молекулярно-динамические эксперименты с использованием библиотеки OpenMM с помощью параметров силового поля AMBER и неявной модели растворителя GBSA. Результирующие координаты были проанализированы с помощью VMD (36) и программного обеспечения UCSF Chimera.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения OriginPro 9.1 (Microcal, Нортгемптон, Массачусетс, США), SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., Калифорния, США) и SigmaStat (SPSS Inc., Калифорния, США). Используемые критерии для каждого эксперимента приведены в его описании в разделе 5 Результаты и обсуждение. Результаты выражены в виде среднего значения данных \pm стандартная ошибка среднего, реже в виде среднего значения \pm стандартное отклонение или среднего с 95% доверительным интервалом для указанного числа независимых экспериментов (n). Во всех тестах $p < 0,05$ принималось как значимое, если не указано иное.

5 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

5.1 Разработка методов цито- и гистохимической детекции и анализа аффинности и специфичности к лигандам Cys-петельных рецепторов с использованием природных пептидно-белковых нейротоксинов, а также их флуоресцентных и биотинилированных аналогов.

α -Нейротоксины длинного типа (66–75 а.о., 5 дисульфидных связей) являются селективными высокоаффинными конкурентными антагонистами $\alpha 7$, $\alpha 9$ и мышечного типа nAХР [432-434], а также, как было продемонстрировано в настоящей работе, определенных подтипов ГАМК_A-рецептора. Комбинаторный подход к использованию природных α -нейротоксинов в сочетании с их модифицированными производными открывает широкие возможности для исследования Cys-петельных рецепторов. В представленной работе α -нейротоксины применялись для аффинной очистки рецепторов, ингибирования их функциональной активности, цито- и гистохимической детекции, анализа аффинности лигандов, количественного определения уровня экспрессии рецепторов и др. В совокупности с другими специфическими лигандами нейрорецепторов (α -конотоксинами, низкомолекулярными веществами) α -нейротоксины предоставляют разноплановый инструментальный для решения нейробиологических задач.

Благодаря широкому распространению в клетках различного происхождения (нейронах, мышечных клетках, иммунных клетках, клетках глии и др.) Cys-петельные рецепторы принимают участие в спектре клеточных процессов: нервной передаче, дифференцировке, защитных механизмах и т.д. (подробнее см. раздел 3.1 Никотиновые и родственные рецепторы нейромедиаторов. Семейство Cys-петельных рецепторов). Для изучения их роли и механизмов функционирования удобными модельными объектами являются клеточные линии с гетерологической (HEK293T, Neuro2a, GH₄C₁) или эндогенной (нейробластома SH-SY5Y, первичные культуры нейронов и иммунных клеток) экспрессией рецепторов, а также срезы, гомогенаты и *ex vivo* препараты тканей животных. В связи с сильно различающимся уровнем экспрессии рецепторов и разнообразным молекулярным окружением в описанных системах возникает необходимость их быстрой и надежной детекции, а также количественного определения.

Применение антител для этой цели осложнено высокой степенью их неселективных реакций [518], что является наиболее критичным при цито- или гистохимическом анализе сложных биологических объектов, таких как клеточные культуры, срезы, биоптаты или

гомогенаты нервной, мышечной и других тканей организма. Напротив, использование для подобных задач производных α -бунгаротоксина (α Bgt (*Bungarus multicinctus*)) и α -кобротоксина (СТХ (*Naja kaouthia*))¹ (флуоресцентных (Alexa Fluor 488- α Bgt, Alexa Fluor 555- α Bgt, Alexa Fluor 546-СТХ, FITC-СТХ, СТХ-наноточки¹), биотинилированных (биот-СТХ, биот- α Bgt) и йодированного ($[^{125}\text{I}]-\alpha$ Bgt)) показало их высокую степень надежности. Это подтверждалось отсутствием реакции с изучаемыми объектами как после их предварительной инкубации с природными трехпетельными α -нейротоксинами змей (или их рекомбинантными аналогами), а также при использовании клеток или тканей животного происхождения, отрицательных по гену изучаемого nAHR, в том числе вследствие его нокаута. Все описанные производные оказались эффективны и были легко детектируемы с помощью флуоресцентной микроскопии, микропланшетного флуориметра или радиоизотопного счетчика.

Мышечный $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nAHR мыши эффективно гетерологически экспрессировался в клетках нейробластомы мыши Neuro2a или HEK293T и детектировался на поверхности 76,5% клеток с использованием флуоресцентного α Bgt после проведения временной трансфекции клеток соответствующими плазмидами (Рис. 5.1А, Б). Для аналогичной экспрессии нейронального гомопентамерного $\alpha 7$ nAHR помимо его генетического материала требовалось введение в клетки плазмид, кодирующих шаперон Ric-3 или NACHO, которые необходимы для сборки функционального гомопентамера в клетках млекопитающих [519-523]. В такой системе мы наблюдали связывание флуоресцентного α Bgt на поверхности 27,6% клеток (Рис. 5.1В, Г). В отсутствие шаперона связывание α Bgt не детектировалось. В контрольном эксперименте после преинкубации клеток со 100-кратным молярным избытком немеченого СТХ специфической цитохимической окраски не наблюдалось (Рис. 5.1Д, Е). Стоит отметить наличие большого пула полностью или частично собранных $\alpha 7$ nAHR внутри клеток, которые способны связывать длинные α -нейротоксины и другие лиганды. Это свойство может быть использовано для повышения уровня детекции рецепторов за счет проведения фиксации и пермеабиллизации клеток или срезов тканей (Рис. 5.1Ж, Рис. 5.2). Также это позволяет проводить дополнительную цито- или гистохимическую окраску изучаемых образцов антителами, интеркалирующими красителями и т.п. (см. главу 5.4.4 Клеточные мишени действия эндогенного АХ. Сенсорные нейроны спинномозгового ганглия).

¹ Предоставлен проф. Уткиным Ю.Н., руководителем Лаборатории молекулярной токсикологии ИБХ РАН

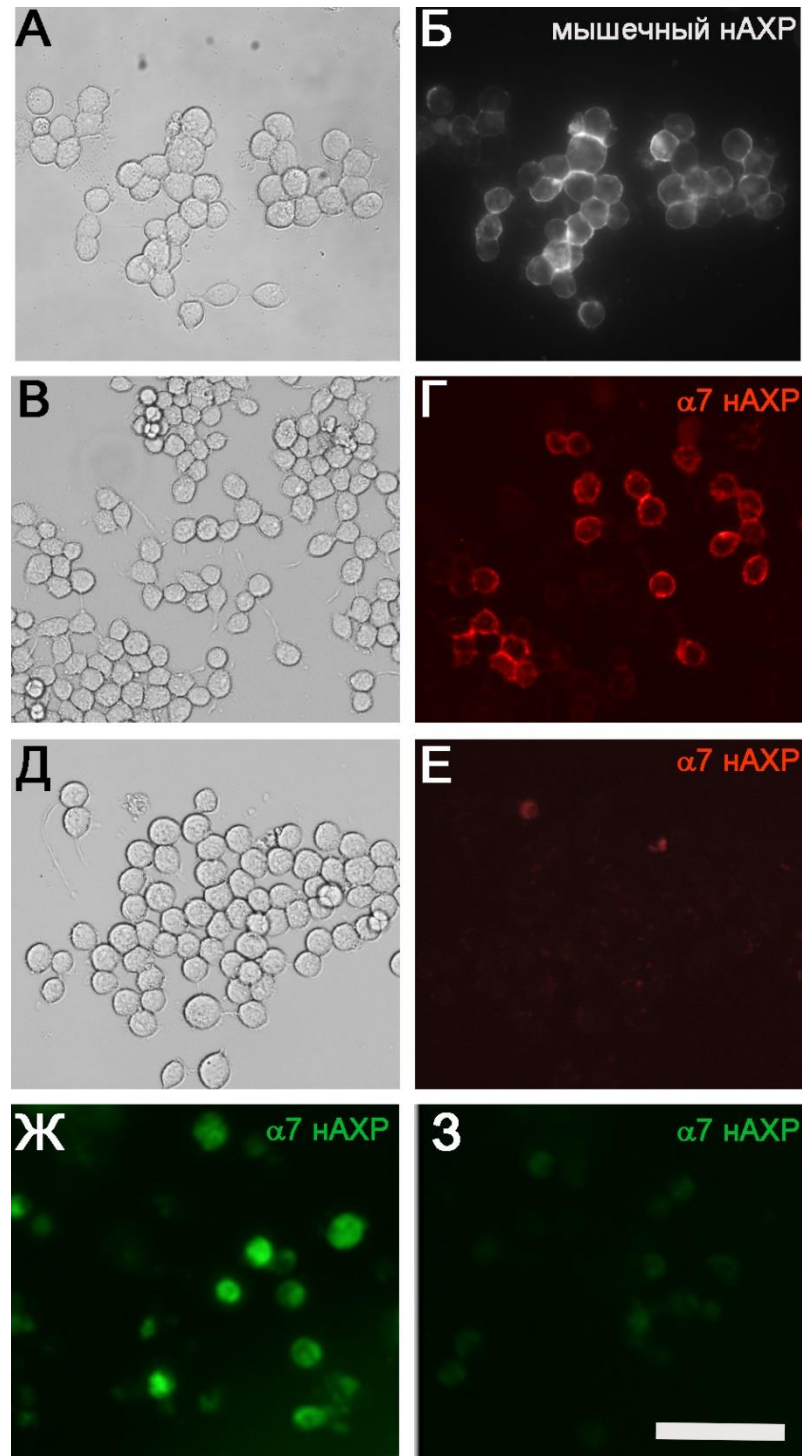


Рис. 5.1 – Примеры цитохимической детекции (А, Б) мышечного и (В – З) $\alpha 7$ нАХР с помощью флуоресцентных производных α -нейротоксинов. Представлено окрашивание клеток нейробластомы Neuro2a, экспрессирующих (А, Б) мышечный и (В – Е) $\alpha 7$ нАХР с использованием Alexa Fluor 555- α Bgt. В контрольном эксперименте (Д, Е) клетки были преинкубированы со 100-кратным молярным избытком немеченого СТХ, что приводило к отсутствию специфической цитохимической окраски клеток. (Ж) Показано окрашивание фиксированных и пермеабелизованных клеток GH₄C₁, стабильно экспрессирующих $\alpha 7$ нАХР человека с использованием Alexa Fluor 488- α Bgt. Также (З) представлен контрольный эксперимент после преинкубации клеток GH₄C₁ с СТХ. Масштаб: 100 мкм.

Повышение уровня экспрессии и, соответственно, детекции nAХР возможно при получении стабильных клеточных линий. В настоящей работе подобная клеточная линия гипофиза крысы GH₄C₁ активно использовалась для изучения аффинности различных лигандов к $\alpha 7$ nAХР методами количественного флуоресцентного (Рис. 5.1Ж, 3) или радиолигандного анализа (Рис. 5.30А, Таблица 5.4), наряду с ней для подобных исследований применялись и линии с временной трансфекцией (НЕК293Т, Neuro2А, Рис. 5.3). Радиолигандный анализ позволял не только проводить скрининг аффинности лигандов, но и количественно оценивать уровень экспрессии рецепторов в тканях животных, что было успешно применено при работе с моделированием заболеваний у животных (см. главу 5.6.2 Ранние стадии болезни Паркинсона).

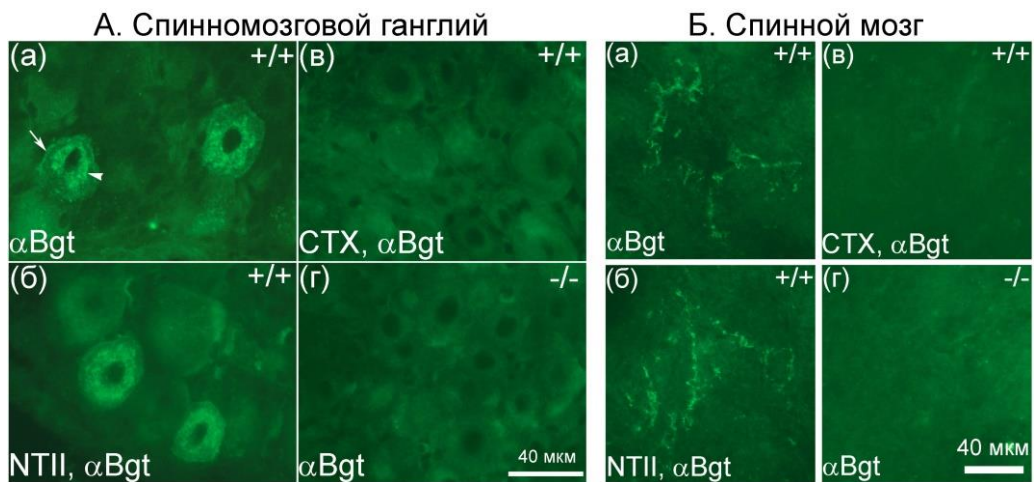


Рис. 5.2 – Связывание Alexa- α Bgt (А) с телами нейронов на срезах спинномозговых ганглиев и (Б) с отростками нейронов на срезах в переднем роге спинного мозга $\alpha 7^{+/+}$ и $\alpha 7^{-/-}$ мышей. (б), (в) – ингибирование связывания Alexa- α Bgt избытком NTII и CTX, соответственно. (г) – отсутствие связывания Alexa- α Bgt со срезами нервной ткани $\alpha 7^{-/-}$ мышей. Стрелкой и острием стрелки показаны окрашенная плазматическая мембрана и внутриклеточные структуры, соответственно.

Флуоресцентный анализ с использованием α -нейротоксинов уступает радиолигандному в чувствительности отчасти из-за более сильных потерь в аффинности агента при получении флуоресцентного или биотинилированного аналога. Так, только радиолигандный анализ надежно демонстрировал относительно невысокий уровень эндогенной экспрессии $\alpha 7$ nAХР в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y. Однако именно на основе комбинации флуоресцентных и природных α -нейротоксинов был разработан метод гистохимической детекции мышечного и $\alpha 7$ nAХР в срезах тканей животных (мышечной ткани языка, нервной ткани спинномозговых ганглиев, спинного и

головного мозга), специфичность которого была доказана с использованием тканей нокаутных по гену $\alpha 7$ nAHP мышей (Рис. 5.2)².

Таким образом, комплексное применение природных, флуоресцентных, биотинилированных и радиоактивно-меченых α -нейротоксинов позволяет решать широкий круг исследовательских задач по детекции и оценке уровня экспрессии функциональных Gys-петельных рецепторов в клетках и тканях, определению их точной внутриклеточной локализации, аксонального транспорта, совместной экспрессии с белковыми маркерами, а также таких функциональных характеристик, как аффинность и специфичность при связывании лигандов разных классов.

5.2 Различия в специфичности, аффинности и механизме связывания трехпетельных α -нейротоксинов с разными Gys-петельными рецепторами и их моделями

α -Нейротоксины длинного типа α -бунгаротоксин и α -кобротоксин являются полными аналогами как в структурном, так и в функциональном плане в отношении их классических мишеней: мышечного, $\alpha 7$ и $\alpha 9$ nAHP. Единственное указание на их возможное сродство к другим представителям Gys-петельных рецепторов содержалось в исследовании связывания α Bgt с неприродными $\beta 3$ и $\alpha 1\beta 3$ ГАМК_A-рецепторами. В настоящей работе было исследовано сродство флуоресцентных производных этих нейротоксинов к природному нейрональному $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ ГАМК_A-рецептору, гетерологически экспрессированному в клетках Neuro2a или НЕК293Т (Рис. 5.3А-3). α -Нейротоксины взаимодействовали с $\alpha 1\beta 3$ и $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ ГАМК_A-рецепторами, но α Bgt существенно уступал в аффинности СТХ (Рис. 5.3А-3), чего не наблюдалось в отношении nAHP, для которых α Bgt является более высокоаффинным антагонистом.

С nAHP связывание α -нейротоксинов длинного типа происходит по конкурентному механизму в ортостерическом сайте связывания. Аналогично СТХ взаимодействует с ГАМК_A-рецепторами, что было подтверждено по вытеснению флуоресцентно-меченного СТХ агонистом мусцимол ($IC_{50} = 15$ мкМ), сайт связывания которого находится в ортостерическом участке в области контакта β и α субъединиц (Рис. 5.3И). Однако даже в самых высоких из протестированных концентраций мусцимол был способен вытеснить только 80% флуоресцентного окрашивания, в то время как немеченый СТХ полностью его

² Нокаутные по гену $\alpha 7$ nAHP мыши предоставлены проф. Куммером В., руководителем Института анатомии и клеточной биологии Университета Ю. Либига г. Гиссена. Германия

подавлял, что может свидетельствовать о наличии дополнительного неконкурентного участка связывания (Рис. 5.3И).

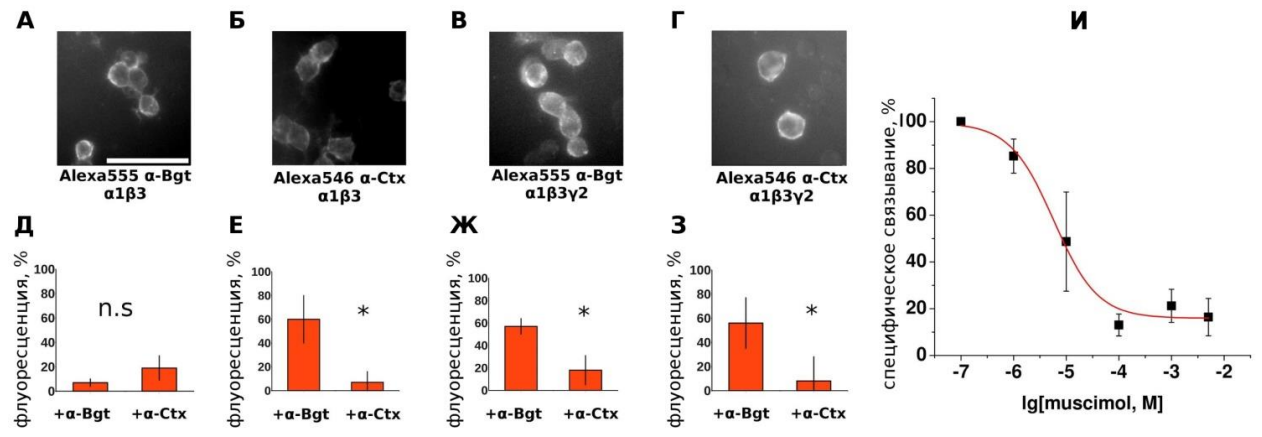


Рис. 5.3 – Различная эффективность нативных α Bgt и CTX и агониста мусцимола при ингибировании связывания Alexa Fluor 555- α Bgt и Alexa Fluor 546-CTX с ГАМК_A-рецепторами, экспрессированными на поверхности клеток нейробластомы Neuro2a. Примеры цитохимического окрашивания клеток, гетерологически экспрессирующих (А, Б) $\alpha 1\beta 3$ и (В, Г) $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ ГАМК_A-рецепторы, с помощью (А, В) Alexa Fluor 555- α Bgt и (Б, Г) Alexa Fluor 546-CTX в концентрации 50 нМ (Масштаб: 50 мкм). (Д - З) Диаграммы отражают эффективность блокирования нативными токсинами (5 мкМ α Bgt и CTX) связывания их флуоресцентно-меченых аналогов с клеточной поверхностью. В большинстве случаев CTX был достоверно более успешным ингибитором флуоресцентного клеточного окрашивания (Е – З), за исключением связывания Alexa Fluor 555- α Bgt с $\alpha 1\beta 3$ ГАМК_A-рецептором, для которого оба нативных токсина оказались высокоэффективными блокаторами. Данные представлены как среднее \pm 95% доверительный интервал по результатам трех независимых экспериментов. Различия считались статистически достоверными ($*p < 0,05$), если 95% доверительные интервалы не пересекались. (И) Кривая ингибирования связывания Alexa Fluor 546-Ctx с $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ ГАМК_A-рецепторами с помощью агониста мусцимола, связывающегося с ортостерическим сайтом в области контакта β/α -субъединиц. Нормализованные данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего за вычетом фонового уровня флуоресценции, наблюдавшегося в присутствии 10 мкМ CTX.

Для более детального изучения действия CTX были проведены электрофизиологические эксперименты³ по ингибированию тока хлорид-ионов в $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ ГАМК_A-рецепторах в сравнении с широкой панелью α -нейротоксинов змей, различных в структурном и фармакологическом плане: длинные (α Bgt, CTX, LsIII *Laticauda semifasciata*, NTI *Naja oxiana*), короткие (NTII *N.oxiana*) и необычные (WTX *N.kaouthia*, OWT *N.oxiana*) α -нейротоксины (Рис. 5.4А)⁴. Наиболее эффективен был CTX, хотя LsIII и

³ Совместно с к.б.н. Кудрявцевым Д.С., Лаборатория лиганд-рецепторных взаимодействий ИБХ РАН

⁴ Нейротоксины предоставлены проф. Уткиным Ю.Н., руководителем Лаборатории молекулярной токсикологии ИБХ РАН

WTX также успешно ингибировали токи, а α Bgt и NTI сильно уступали в ингибирующем действии. Стоит отметить, что в концентрации 5 мкМ СТХ полностью блокировал активность другого природного нейронального ГАМК_A-рецептора композиции α 1 β 3 δ (Рис. 5.4А).

В присутствии СТХ (250 нМ) параметр EC₅₀ (ГАМК) α 1 β 3 γ 2 ГАМК_A-рецептора изменялся с 29 до 128 мкМ, соответствующая кривая не достигала насыщения при высоких концентрациях агониста и напоминала двухсайтовую (Рис. 5.4Б). Вероятно, форма кривой отражает аллостерические изменения в рецепторе при связывании СТХ с первым ортостерическим участком, которые приводят к уменьшению сродства ГАМК к другому ортостерическому сайту, а также позволяет предположить существование дополнительно неконкурентного механизма ингибирования ГАМК_A-рецептора токсином.

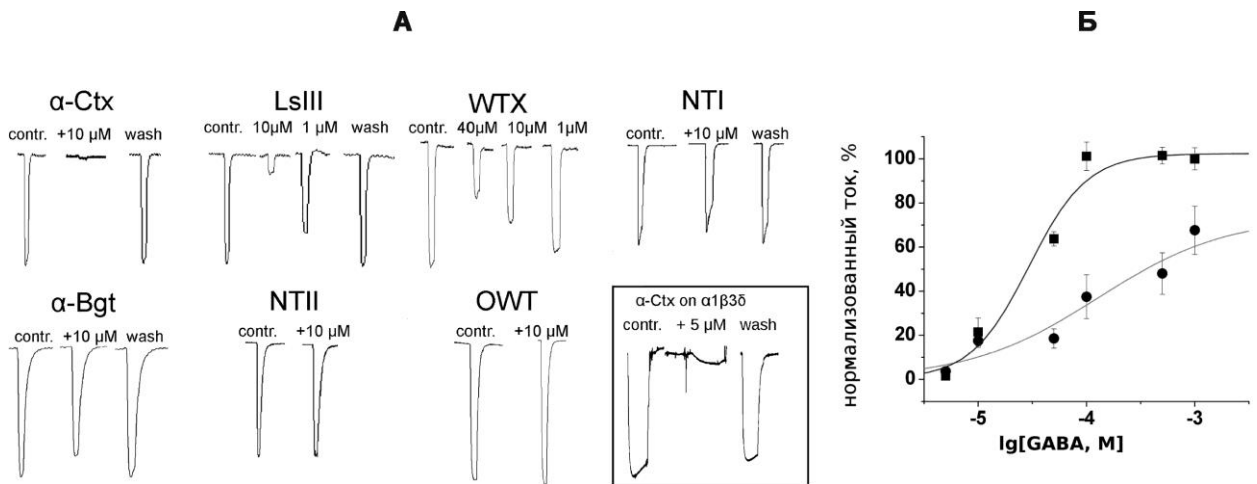


Рис. 5.4 – Ингибирующее действие ряда трехпетельных токсинов из ядов змей на ГАМК_A-рецепторы. (А) Представлены примеры ионных токов в ооцитах шпорцевой лягушки, вызванных активацией гетерологически экспрессированных α 1 β 3 γ 2 ГАМК_A-рецепторов с помощью 10 мкМ ГАМК (EC₂₀₋₅₀) в контрольных условиях и в присутствии указанных концентраций трехпетельных токсинов. Врезка справа в нижнем ряду отражает ингибирование α 1 β 3 δ рецептора. (Б) Кривые дозозависимой активации ионных токов в α 1 β 3 γ 2 ГАМК_A-рецепторе с использованием разных концентраций ГАМК в контрольных условиях (черные квадраты, кривая черного цвета) и в присутствии 250 нМ Стх (черные круги, кривая серого цвета). В присутствии ингибитора кривая сдвинута в сторону более высоких концентраций ГАМК, но ионные токи не достигают максимально возможной амплитуды, что свидетельствует о смешанном конкурентном/неконкурентном типе ингибирования.

СТХ проявлял избирательность по отношению к определенным подтипам ГАМК_A-рецепторов. Так, при ингибировании ГАМК(10 мкМ)-индуцированных токов его аффинность к α 1 β 3 γ 2 рецептору оказалась почти в пять раз выше (IC₅₀=236 мкМ), чем к

$\alpha 2\beta 3\gamma 2$ подтипу ($IC_{50}=1099$ мкМ). Принимая во внимание важную роль положительного заряда центральной петли СТХ в связывании с нАХР, мы предположили, что данное взаимодействие может быть решающим и в изучаемой реакции (модель на Рис. 5.5А). Действительно, при точечной замене серина (S67) в ортостерическом сайте $\alpha 1$ -субъединицы на положительно-заряженную аминокислоту лизин (K67), расположенную в гомологичном положении в $\alpha 2$ -субъединице, сродство $\alpha 1(S67K)\beta 3\gamma 2$ рецептора к СТХ заметно ухудшалось (Рис. 5.4Б). Обратный эффект был замечен при мутации $\alpha 2(K67S)$ (Рис. 5.5Б). Полученные данные подтверждают правильность построенной модели взаимодействия СТХ с ГАМК_A-рецептором в ортостерическом участке связывания в области контакта β - и α -субъединиц (Рис. 5.5А).

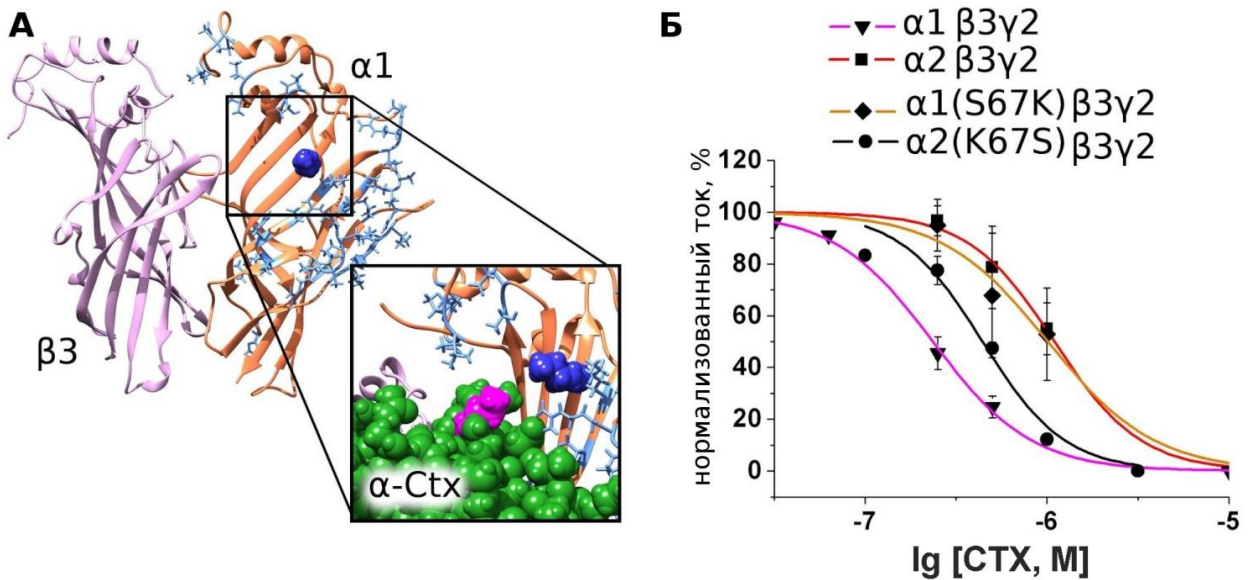


Рис. 5.5 – Влияние замены аминокислотного остатка 67 положения в ортостерическом лиганд-связывающем участке ГАМК_A-рецептора на связывание СТХ. (А) Показаны внеклеточные домены субъединиц $\beta 3/\alpha 1$, образующие лиганд-связывающий участок. Аминокислотные остатки, которые отличаются в $\alpha 1$ и $\alpha 2$ субъединицах, показаны синим цветом, консервативная часть $\alpha 1$ субъединицы окрашена в оранжевый цвет. Ser-67 в структуре $\alpha 1$ субъединицы (темно-синий цвет) является одним из остатков, наиболее близко расположенных к молекуле лиганда в участке связывания. Врезка демонстрирует, что согласно молекулярному моделированию, при замене этого остатка на Lys-67 (как в структуре $\alpha 2$ субъединицы), он практически соприкасается с остатком лизина петли II молекулы СТХ (выделен пурпурным цветом). (Б) Ингибирование ионного тока в мутантном рецепторе $\alpha 1(S67K)\beta 3\gamma 2$ с помощью СТХ характеризуется более высоким значением $IC_{50} = 703$ нМ по сравнению с нативным $\alpha 1\beta 3\gamma 2$. При этом ингибирование мутантного рецептора $\alpha 2(K67S)\beta 3\gamma 2$ характеризуется более низким значением $IC_{50}(\text{СТХ}) = 442$ нМ, чем в случае природного $\alpha 2\beta 3\gamma 2$, что указывает на важность участка в области контакта β/α для связывания СТХ. Для активации рецепторов использовали ГАМК в концентрации 10 мкМ, слегка меньшей EC_{50} . Амплитуды ионных токов были нормализованы и представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

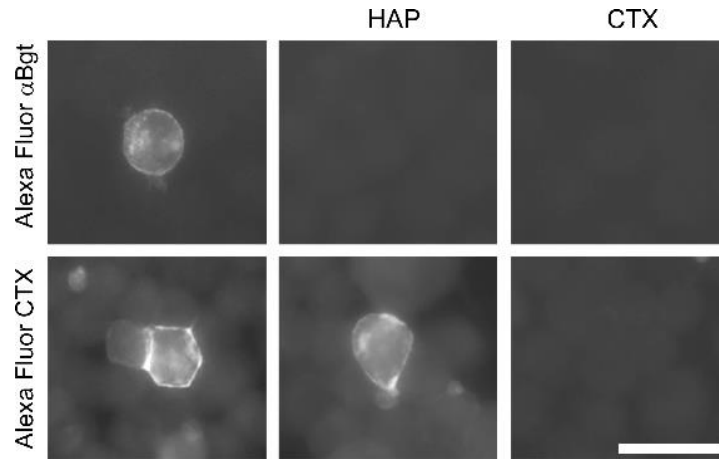


Рис. 5.6 – Влияние пептида HAP (high-affinity peptide) на связывание флуоресцентных аналогов α -бунгаротоксина и α -кобротоксина с $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ ГАМК_A-рецептором, экспрессированном в Neuro2a клетках. Предварительная инкубация флуоресцентных токсинов с 10 мкМ HAP предотвращала клеточное окрашивание с использованием Alexa Fluor 555- α Bgt, но не Alexa Fluor 546-CTX (средняя колонка). Молярный 40-кратный избыток немеченого CTX полностью подавлял окрашивание в обоих случаях (правая колонка), подтверждая специфичность наблюдающегося связывания. Масштаб: 25 мкм.

Различия в механизме связывания α Bgt и CTX также проявились при их взаимодействии с потенциальными моделями ортостерического лиганд-связывающего участка nAChR – пептидом HAP (high-affinity peptide) и его аналогами. 13-членный пептид HAP (WRYYESSLLPYPD) был ранее получен из комбинаторной библиотеки пептидов, он высокоомологичен фрагменту петли С лиганд-связывающего сайта мышечного и $\alpha 7$ nAChR. В составе пептида два соседних высококонсервативных аминокислотных остатка С192–С193 заменены на остатки серина. Его уникальность проявлялась в высокоаффинном взаимодействии с α Bgt (2 нМ), сравнимом со сродством этого α -нейротоксина к полноразмерному nAChR. В кристаллической структуре комплекса HAP с α Bgt [524] пептид демонстрировал конформацию, весьма сходную с петлей С в кристаллической структуре ацетилхолинсвязывающего белка, являющегося эталонной структурной моделью лиганд-связывающего домена nAChR [27]. В наших опытах с применением ряда методов (конкурентный флуоресцентный и радиолигандный анализ⁵, электрофизиология⁶ и кальциевый имиджинг) преинкубация α Bgt с пептидом HAP и его аналогами полностью подавляла ингибирующее действие этого α -нейротоксина на мышечный и $\alpha 7$ nAChR, а также на ГАМК_A-рецептор (Рис. 5.6). При использовании CTX

⁵ Совместно с д.х.н. Кашеверовым И.Е., руководителем Лаборатории лиганд-рецепторных взаимодействий ИБХ РАН

⁶ Совместно с к.б.н. Кудрявцевым Д.С., Лаборатория лиганд-рецепторных взаимодействий ИБХ РАН

пептид НАР и его аналоги не препятствовали связыванию данного α -нейротоксина с исследованными мишенями (Рис. 5.6), либо только частично подавляли его действие даже при большем молярном избытке. Также какого-либо эффекта данных коротких пептидов не было отмечено при исследовании ряда α -конотоксинов, высокоаффинных антагонистов мышечного или $\alpha 7$ нАХР. Таким образом, трехпетельные α -нейротоксины, являющиеся полными структурно-функциональными аналогами в отношении нАХР, основной мишени их действия, проявляют сильную гетерогенность в селективности, аффинности и механизме связывания с неклассическими мишенями: ГАМК_A-рецепторами и моделями лиганд-связывающего участка нАХР.

5.3 Определение селективности, аффинности и механизма ингибирования нАХР синтетическим трехпетельным белком SLURP-1 человека. Подход кальциевого имиджинга.

Структурными аналогами α -нейротоксинов являются трехпетельные белки млекопитающих (белки семейства Ly6), впервые обнаруженные в клетках иммунной системы млекопитающих [432, 525]. Помимо сходных трехмерных структур, эти белки объединяет похожая генетическая организация и расположение остатков цистеина, которые образуют стабилизирующие структуру дисульфиды. Эти общие особенности свидетельствуют о том, что белки семейства Ly6 и α -нейротоксины яда змей эволюционно связаны, но несмотря на их структурное сходство, сведения о функциональной связи между этими двумя семействами появились только недавно.

Большинство белков семейства Ly6 связаны с мембраной посредством гликозилфосфатидилинозитола (ГФИ-якорь), но некоторые представители являются секретлируемыми белками, например, SLURP-1 (secreted Ly6/urokinase-type plasminogen receptor-related protein). Этот белок первоначально был выделен из пептидных библиотек крови и мочи человека [526]. Затем он также был найден в кератиноцитах и было обнаружено, что мутации гена SLURP-1 являются причиной развития редкой наследственной ладонно-подошвенной кератодермии, называемой болезнью острова Меледа. Также SLURP-1 принимает участие в ряде клеточных регуляторных механизмов в нервной и иммунной системах организма [527-529]. Однако механизм его действия остается неоднозначным в связи с существенными различиями в опубликованных модулирующих активностях ряда рекомбинантных форм SLURP-1 в отношении нАХР, в основном гомопентамерного $\alpha 7$ подтипа [527-531].

В настоящей работе тестировался химически синтезированный SLURP-1 человека⁷, который не конкурировал с [¹²⁵I]- α Bgt за связывание с $\alpha 7$ и мышечным nAHP или модельными ацетилхолин-связывающими белками⁸, т.о. его действие не могло быть оценено описанными ранее методами с использованием α -нейротоксинов. В связи с этим был получен ряд флуоресцентных аналогов SLURP-1 (FITC-SLURP-1, Alexa Fluor 546-SLURP-1), но достоверного взаимодействия конъюгатов с модельными белками (АХСБ, экстрацеллюлярный домен $\alpha 9$ nAHP) и полноразмерным $\alpha 7$ nAHP человека выявлено не было. Для оценки влияния SLURP-1 на функциональную активность $\alpha 7$ nAHP было решено разработать подход кальциевого имиджинга на основе гетерологической экспрессии этого рецептора в клетках млекопитающих.

При временной трансфекции клеток Neuro2a или HEK293T использовались плазмиды, кодирующие $\alpha 7$ субъединицу nAHP, шаперон (Ric-3 или NACHO) и флуоресцентный одноволновой белковый кальциевый сенсор Case12 (491/516 нм). Экспрессию $\alpha 7$ nAHP визуализировали по связыванию Alexa Fluor 555- α Bgt (Рис. 5.7А, Б) с рецепторами на поверхности клеток. Параллельно детектировали флуоресценцию белкового кальциевого сенсора Case12 внутри клеток (Рис. 5.7А, В, Г). Интенсивность окрашивания α -бунгаротоксином различалась среди клеток, но для 95% клеток она значительно превышала фоновый уровень (Рис. 5.7Е). Введение дополнительной плазмиды с геном Case12 не снижало эффективности экспрессии $\alpha 7$ nAHP (Рис. 5.7Д). Яркость флуоресценции кальциевого сенсора Case12 в α Bgt -позитивных клетках была не только выше фонового уровня, но значительно превышала среднюю интенсивность таковой в общей популяции клеток Neuro2a (Рис. 5.7Ж). При этом была замечена лишь слабая корреляция интенсивностями флуоресценции Alexa Fluor 555- α Bgt и Case12 ($r = 0,4$, корреляционный тест Пирсона, $p = 2,2 * e^{-16}$), что может объясняться сильной зависимостью флуоресценции Case12 не только от эффективности его экспрессии в отдельных клетках, но и от внутриклеточной концентрации ионов кальция.

⁷ Синтетический белок человека SLURP-1 предоставлен к.х.н. Дюреком Т., Институт молекулярной биологии Университета Квинсленда, Австралия

⁸ Совместно с д.х.н. Кашеверовым И.Е., руководителем Лаборатории лиганд-рецепторных взаимодействий ИБХ РАН

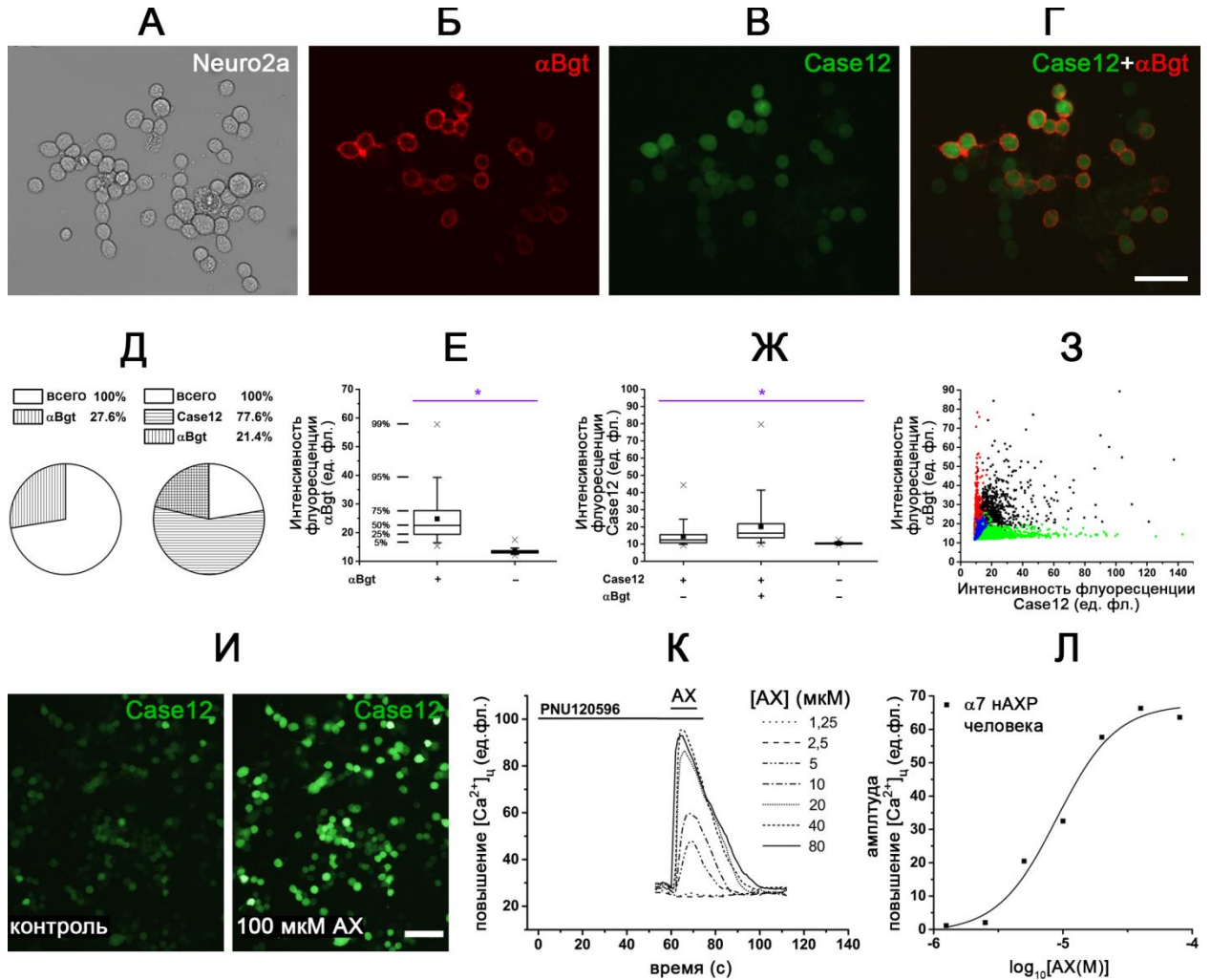


Рис. 5.7 – Функциональная экспрессия человеческого $\alpha 7$ нАХР в присутствии шаперона NAC10 и генетически кодируемого флуоресцентного сенсора ионов кальция Case12 в клетках нейробластомы мыши Neuro2a. (А, Б) Цитохимическое обнаружение $\alpha 7$ нАХР с помощью 50 нМ Alexa Fluor 555- α -бунгаротоксина (α Bgt, красный цвет) и (В, Г) его совместная экспрессия с Case12 (зеленый цвет) в клетках Neuro2a. (Д) Круговые диаграммы представляют процент трансфицированных клеток Neuro2a, окрашенных Alexa Fluor 555- α -бунгаротоксином (α Bgt) в отсутствие ($n = 3$, 2521 (всего) и 696 (окрашенных α Bgt) клеток) или в присутствии Case12 ($n = 3$, 3141 (всего), 2464 (с Case12) и 745 (окрашенных α Bgt)). (Е) Графики интенсивности флуоресценции Alexa Fluor 555- α -бунгаротоксина (α Bgt) по сравнению с фоновым уровнем ($n = 3$, 1215 и 7641 клеток, соответственно, двухвыборочный t-критерий Стьюдента для независимых выборок, $*p < 0,05$) в клеточной популяции. (Ж) Графики интенсивности флуоресценции Case12 в общей популяции клеток и в окрашенных α -бунгаротоксином клетках, а также интенсивности фоновой клеточной флуоресценции ($n = 3$, 8315, 1217 и 7643 клеток, соответственно, однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), $*p < 0,05$). (З) Корреляция между интенсивностями флуоресценции Alexa Fluor 555- α -бунгаротоксина (α Bgt) и Case12 в совместно меченных клетках Neuro2a (черные точки, слабая корреляция, $r = 0,4$, корреляционный тест Пирсона, $p = 2,2e-16$, $n = 3$, 1217 клеток). Красные и зеленые точки представляют собой интенсивности флуоресценции Alexa Fluor 555- α Bgt и Case12 в моно-окрашенных популяциях клеток, соответственно ($n = 3$, 1209 и 8315 клеток, соответственно). Синие точки демонстрируют фоновый уровень интенсивности флуоресценции ($n = 3$, 7643 клетки). Репрезентативные (И) микроскопические

изображения (масштаб: 100 мкм) и (К) график возрастания внутриклеточной концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]_i$) в клетке Neuro2a, экспрессирующей $\alpha 7$ nAХР человека, шаперон NACHO и флуоресцентный сенсор ионов кальция Case12 при добавлении ацетилхолина. (Л) Соответствующая кривая дозозависимости амплитуды возрастания $[Ca^{2+}]_i$. (И) $73,5 \pm 1,0\%$ ($n = 3$, 1191 клеток в общей сложности и 880 АХ-чувствительных клеток) клеток с экспрессией Case12 реагировали на добавление 100 мкМ ацетилхолина. Клетки Neuro2a предварительно инкубировали с 10 мкМ PNU120596, положительным аллостерическим модулятором $\alpha 7$ nAХР. ед.фл. – единицы флуоресценции.

Экспрессия белкового кальциевого сенсора Case12 также позволяла визуально оценивать эффективность проведенной клеточной трансфекции и жизнеспособность клеток. Так, Case12 экспрессировался в $77,6 \pm 1,5\%$ (Рис. 5.7Д), что хорошо коррелировало со средним числом клеток ($73,5 \pm 1,0\%$, среднее значение \pm стандартная ошибка среднего), реагирующих на добавление ацетилхолина (АХ) резким повышением внутриклеточной концентрации ионов кальция $[Ca^{2+}]_i$ за счет активации $\alpha 7$ nAХР (Рис. 5.7И). Наблюдаемые клеточные ответы были опосредованы активацией $\alpha 7$ nAХР, поскольку полностью блокировались при использовании его специфического ингибитора 2 мкМ СТХ. На основе амплитуд клеточных ответов строились кривые дозозависимости аффинности $\alpha 7$ nAХР к агонистам (Рис. 5.7К, Л).

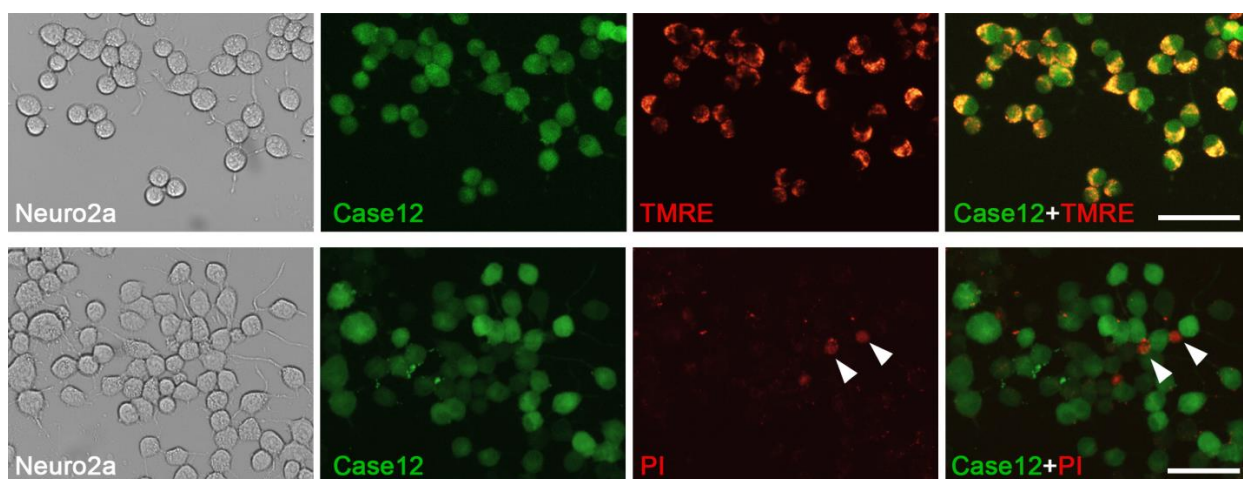


Рис. 5.8 – Экспрессия флуоресцентного сенсора ионов кальция Case12 в клетках Neuro2a коррелировала с маркерами жизнеспособности клеток. Цитохимическое окрашивание клеток Neuro2a, трансфицированных плазмидами, кодирующими $\alpha 7$ nAХР человека, шаперон NACHO и кальциевый сенсор Case12 показало, что $93,5 \pm 0,7\%$ (среднее \pm стандартная ошибка среднего) клеток с экспрессией Case12 (зеленый цвет) были помечены маркером жизнеспособности клеток этиловым эфиром тетраметилродамина (20 нМ, tetramethylrhodamine ethyl ester, TMRE, верхняя панель, красный цвет, $n = 3,1240$ клеток). Флуоресценция Case12 отсутствовала в нежизнеспособных клетках Neuro2a, окрашенных ДНК-связывающим реагентом йодидом пропидия (50 нг/мл, PI, нижняя панель, красный цвет, ядра отмечены стрелками, $n = 3, 1561$ клеток). Масштаб: 60 мкм.

Уровень жизнеспособности Case12-позитивных клеток после проведения процедуры трансфекции был очень высоким ($93,5 \pm 0,7\%$, среднее значение \pm стандартная ошибка среднего), что было выявлено при окрашивании клеточной популяции специфическим витальным красителем - этиловым эфиром тетраметилродамина (TMRE, Рис. 5.8, верхняя панель). При этом не было обнаружено совместной локализации флуоресценции Case12 и йодида пропидия, не проникающего через мембрану интеркалирующего агента, связывающегося с ДНК в ядрах мертвых клеток (Рис. 5.8, нижняя панель). Таким образом, Case12 был весьма удобен в качестве индикатора жизнеспособности клеток.

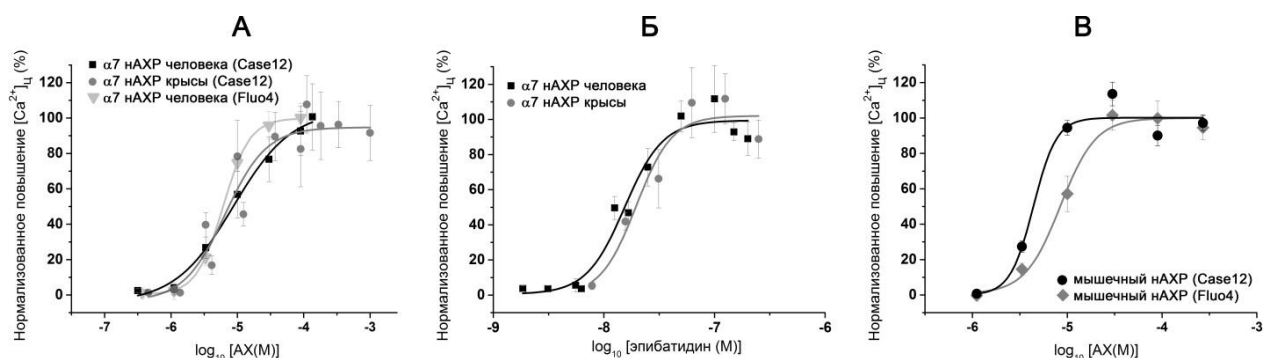


Рис. 5.9 – Кривые дозозависимости амплитуды повышения внутриклеточной концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]_{ц}$) в клетках Neuro2a, экспрессирующих (А, Б) $\alpha 7$ нАХР и (В) мышечный $\alpha 1\beta 1\epsilon$ нАХР, при добавлении агонистов. Для регистрации изменений $[Ca^{2+}]_{ц}$ использовались (А-В) белковый (Case12) и (А, В) низкомолекулярный (Fiuo-4) сенсоры. (А, Б) Клетки предварительно инкубировали в течение 20 мин с 10 мкМ PNU120596, положительным аллостерическим модулятором $\alpha 7$ нАХР. Каждая точка графиков отражает данные, полученные в 4 независимых экспериментах (среднее \pm стандартная ошибка среднего).

Подход кальциевого имиджинга был разработан в двух модификациях: регистрация ответов отдельных клеток (Рис. 5.7И-Л) и клеточных популяций (Рис. 5.9) с использованием флуоресцентного микроскопа и микропланшетного флуориметра, соответственно. EC_{50} ацетилхолина для $\alpha 7$ нАХР человека, измеренное обоими методами хорошо согласовывалось (8,17 мкМ, Рис. 5.7К, Л и 8,69 мкМ, Рис. 5.9А, Табл. 5.1, соответственно), и коррелировало с данными, полученными при использовании стандартного коммерчески доступного низкомолекулярного кальциевого индикатора Fiuo-4 (6,12 мкМ, Рис. 5.9А, Табл. 5.1), и электрофизиологическими измерениями⁹ (19 мкМ, Рис. 5.10). Также этим методом были получены весьма сходные параметры взаимодействия с АХ и эпибатидином $\alpha 7$ нАХР человека и крысы (Рис. 5.9А, Б, Табл. 5.1). Стоит отметить, что для снижения скорости десенситизации $\alpha 7$ нАХР и повышения

⁹ Совместно с к.б.н. Кудрявцевым Д.С., Лаборатория лиганд-рецепторных взаимодействий ИБХ РАН

амплитуды клеточных ответов при проведении как кальциевого имиджинга, так и пэтч-клампа был применен специфический положительный модулятор PNU120596 в насыщающей концентрации 10 мкМ (Рис. 5.6Б, Г) [286, 532]. Данный модулятор взаимодействует с обособленным трансмембранным аллостерическим участком связывания, таким образом не препятствуя реакциям агонистов и конкурентных антагонистов с ортостерическим сайтом $\alpha 7$ нАХР [101, 110, 111, 533].

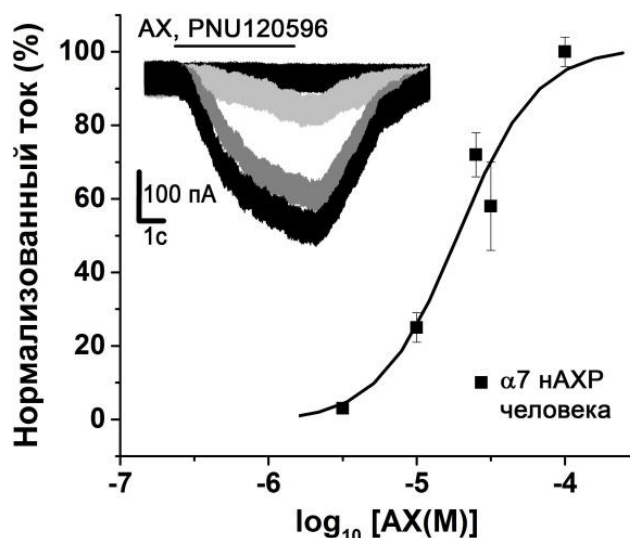


Рис. 5.10 – Электрофизиологические измерения методом пэтч-клампа реакций $\alpha 7$ нАХР человека, экспрессированных в клетках Neuro2a, на добавление ацетилхолина. Приведены примеры ионных токов в $\alpha 7$ нАХР, вызванных воздействием 3, 10, 30 и 100 мкМ АХ и кривая дозозависимости клеточных ответов. Все растворы АХ содержали положительный аллостерический модулятор 10 мкМ PNU120596, вызывая усиленные и длительные ответы $\alpha 7$ нАХР на ацетилхолин. Кривая была построена на основе усредненных данных (среднее \pm стандартное отклонение), полученных для 7 клеток в трех независимых опытах.

Разработанный подход кальциевого имиджинга был также успешно применен для анализа активности мышечного рецептора $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ нАХР мыши (Рис. 5.9В, Табл. 5.1). Протокол упрощался из-за отсутствия необходимости добавления гена шаперона при трансфекции клеток Neuro2a, а также позитивного аллостерического модулятора перед добавлением ацетилхолина. Полученные фармакологические параметры хорошо согласовывались с данными литературы и результатами кальциевого имиджинга с использованием стандартного низкомолекулярного кальциевого индикатора Fluo-4 (Рис. 5.9В, Табл. 5.1). Хотя подобные коммерчески доступные флуоресцентные индикаторы широко используются при скрининге аффинности лигандов ионных каналов [534-536], они имеют ряд существенных недостатков: высокая стоимость, ограниченный срок годности, сильные различия в индивидуальных опытах при введении кальциевого сенсора

в клетки и необходимость использования цитотоксических ингибиторов клеточных транспортеров (например, пробенецида) для предотвращения выхода сенсора из клеток в процессе анализа. Применение белкового кальциевого сенсора Case12 позволяет избежать всех вышеперечисленных трудностей и значительно упрощает и ускоряет протокол кальциевого имиджинга, т.к. нет необходимости наполнять клетки низкомолекулярным индикатором ионов кальция, что требует довольно длительного времени и часто приводит к сильной неоднородности получаемых результатов. Однако при исследовании активности эндогенных лиганд-управляемых ионных каналов рациональнее применять низкомолекулярный кальциевый индикатор, т.к. перед функциональным анализом не проводится трансфекция клеток. Эта техника была нами успешно использована для анализа фармакологии гомо- и гетеропентамерных рецепторов ($\alpha 7$ и $\alpha 3$ -содержащих nAHP, соответственно) клеточной линии нейробластомы человека SH-SY5Y (данные не приведены).

Таблица 5.1. Аффинность $\alpha 7$ nAHP к агонистам, измеренная методом кальциевого имиджинга.

Рецептор	Кальциевый имиджинг	
	Ацетилхолин, EC ₅₀ (95% дов. инт.), мкМ	Эпibatидин, EC ₅₀ (95% дов. инт.), нМ
$\alpha 7$ nAHP человека	8,69 (4,79 – 15,8) 6,12 (5,64 – 6,64)*	15,42 (10,54 – 22,56)
$\alpha 7$ nAHP крысы	6,54 (3,32 – 12,89)	19,64 (10,26 – 36,62)
мышечный nAHP	4,39 (3,18 – 6,06) 8,47 (6,24 – 11,51)*	

Все растворы лигандов содержали 10 мкМ PNU120596.

* Низкомолекулярный индикатор ионов кальция Fluo-4 (Thermo Fisher Scientific, США) был применен вместо генетически кодируемого сенсора Case12. 95% дов. инт. – 95% доверительный интервал.

Разработанный протокол с использованием Case12 также имеет ряд преимуществ перед другим подходом кальциевого имиджинга для анализа аффинности лигандов ионных каналов, который основан на применении стабильных клеточных линий, экспрессирующих определенный подтип nAHP и FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)-ориентированный белковый кальциевый сенсор [532]. Получение стабильной клеточной линии – очень трудоемкая задача и становится практически невыполнимой при необходимости проведения скрининга для ряда мутантных nAHP. Применение Case12 в этом случае гораздо предпочтительнее, т.к. возможно проведение совместной временной трансфекции клеток для каждой индивидуальной мутантной формы nAHP. Таким

образом, в настоящей работе впервые разработан метод кальциевого имиджинга nAHP с применением одноволнового белкового кальциевого сенсора, что позволяет проводить анализ при использовании стандартного флуоресцентного микроскопа или микропланшетного флуориметра в отличие от FRET-ориентированных белковых индикаторов, для детекции которых нужна гораздо более сложная техническая база.

Далее разработанный протокол кальциевого имиджинга с белковым сенсором Case12 был применен для оценки влияния SLURP-1 на функциональную активность $\alpha 7$ nAHP, основной предполагаемой мишени его действия в организме человека. Кальциевый имиджинг выявил, что добавление 5 мкМ SLURP-1 статистически достоверно ингибирует эпибатидин-индуцированное повышение $[Ca^{2+}]_i$ в клетках Neuro2a, экспрессирующих $\alpha 7$ nAHP человека (59% ингибирования при 150 нМ концентрации эпибатидина в присутствии 10 мкМ позитивного аллостерического модулятора PNU120596, Рис. 5.11А). В то же время на мышечный $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nAHP мыши SLURP-1 не оказывал подобного эффекта (Рис. 5.12). В электрофизиологических тестах вне зависимости от используемой концентрации агониста (10 – 1000 мкМ AX) 10 мкМ SLURP-1 не оказывал ингибиторного действия на $\alpha 7$ nAHP человека (Рис. 5.11Б, В) или крысы (Рис. 5.11Г).

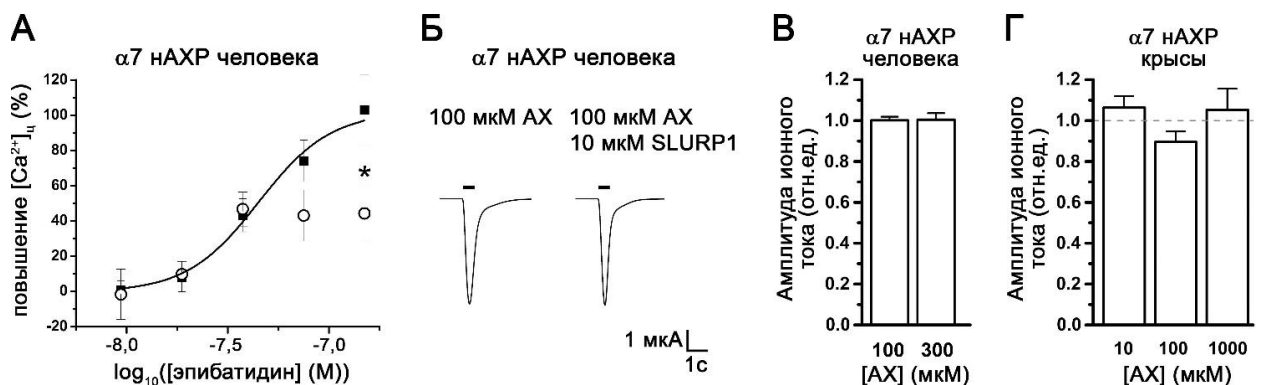


Рис. 5.11 – Эффекты синтетического белка SLURP-1 человека на клеточные ответы, вызванные активацией $\alpha 7$ nAHP в ответ на воздействие агонистов. (А) Кривые дозозависимости клеточных ответов нейробластомы мыши Neuro2a, экспрессирующих $\alpha 7$ nAHP человека, на добавление различных концентраций эпибатидина в контроле (черные квадраты, $EC_{50} = 44,9 \pm 4,6$ нМ) и в присутствии 5 мкМ SLURP-1 (круги). Оценивалась амплитуда повышения внутриклеточной концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]_i$). Измерения проводились в присутствии PNU120596 (10 мкМ). (Б) Примеры ионных токов, проходящих через $\alpha 7$ nAHP человека при добавлении ацетилхолина (AX) в контрольных условиях и в присутствии 10 мкМ SLURP-1. (В) Влияние 10 мкМ SLURP-1 на амплитуду AX-индуцированных ионных токов в $\alpha 7$ nAHP человека и (Г) $\alpha 7$ nAHP крысы, экспрессированных в ооцитах шпорцевой лягушки. Данные приведены как среднее \pm стандартная ошибка среднего по результатам 3 – 10 независимых опытов, * $p < 0,05$, двухвыборочный t-критерий Стьюдента для независимых выборок.

Дополнительный электрофизиологический скрининг¹⁰ действия SLURP-1 на ряд нейрональных гетеромерных nAHP человека выявил предпочтительное ингибирование рецепторов, содержащих $\alpha 3$ и $\beta 4$ субъединицы (Рис. 5.13А, Б). Так, 10 мкМ SLURP-1 подавлял ионные токи, вызванные действием АХ (в концентрации, соответствующей EC_{50}), в $\alpha 3\beta 4$ nAHP на $\sim 60\%$ и в $\alpha 3\beta 2$ и $\alpha 4\beta 4$ nAHP на $\sim 30\%$, но не действовал на $\alpha 4\beta 2$ и $\alpha 9\alpha 10$ nAHP. При активации $\alpha 3\beta 4$ nAHP более высокой концентрацией АХ (1000 мкМ) ингибирование 10 мкМ SLURP-1 сохранялось на том же уровне ($\sim 60\%$), при использовании же более низких концентраций АХ (30 и 100 мкМ) степень ингибирования возрастала до $> 80\%$. Концентрация полумаксимального ингибирования АХ (300 мкМ)-опосредованных ионных токов в $\alpha 3\beta 4$ nAHP с помощью 10 мкМ SLURP-1 (IC_{50} (SLURP-1)) составила $4,75 \pm 0,78$ мкМ. В совокупности эти данные могут свидетельствовать о расположении сайта связывания SLURP-1 в области контакта $\alpha 3$ и $\beta 4$ -субъединиц.

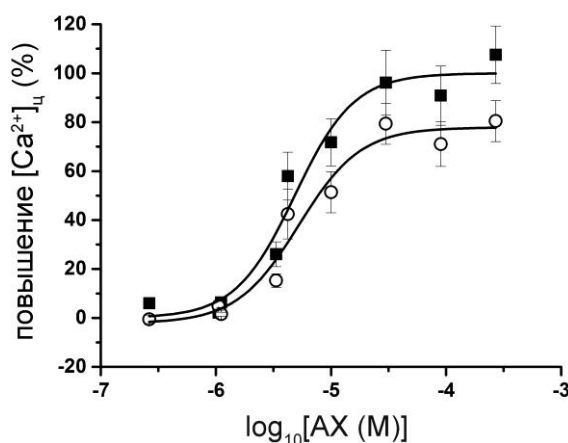


Рис. 5.12 – Отсутствие эффекта синтетического белка SLURP-1 человека на клеточные ответы, вызванные активацией мышечного nAHP. Приведены кривые дозозависимости клеточных ответов нейробластомы мыши Neuro2a, экспрессирующей мышечный $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nAHP мыши, на добавление различных концентраций АХ в контроле (черные квадраты) и в присутствии 5 мкМ SLURP-1 (круги). Оценивалась амплитуда повышения внутриклеточной концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]_i$). Измерения проводились в присутствии PNU120596 (10 мкМ). Данные приведены как среднее \pm стандартная ошибка среднего по результатам 3 независимых опытов, $*p > 0.05$, двухвыборочный t-критерий Стьюдента для независимых выборок.

Интересно, что хотя SLURP-1 не ингибировал подтип $\alpha 9\alpha 10$ nAHP человека в присутствии 6 мкМ АХ (EC_{50}), его ингибирование становилось очевидным при использовании более высоких концентраций 100 и 300 мкМ АХ (подавление амплитуды ионного тока $\sim 25\%$ и $\sim 40\%$, соответственно) (Рис. 5.13Б). Аналогичная зависимость его активности от концентрации АХ прослеживалась в отношении $\alpha 9\alpha 10$ nAHP крысы (Рис.

¹⁰ Совместно с к.б.н. Тае Х.-Ш., Университет Вуллонгонг, Австралия

5.13В). Суммируя все результаты, полученные для $\alpha 7$ и $\alpha 9\alpha 10$ nAХР, можно утверждать, что SLURP-1 является их негативным эндогенным аллостерическим модулятором, который проявляет активность в отношении рецепторов, которые находятся в стабильной открытой конформации.

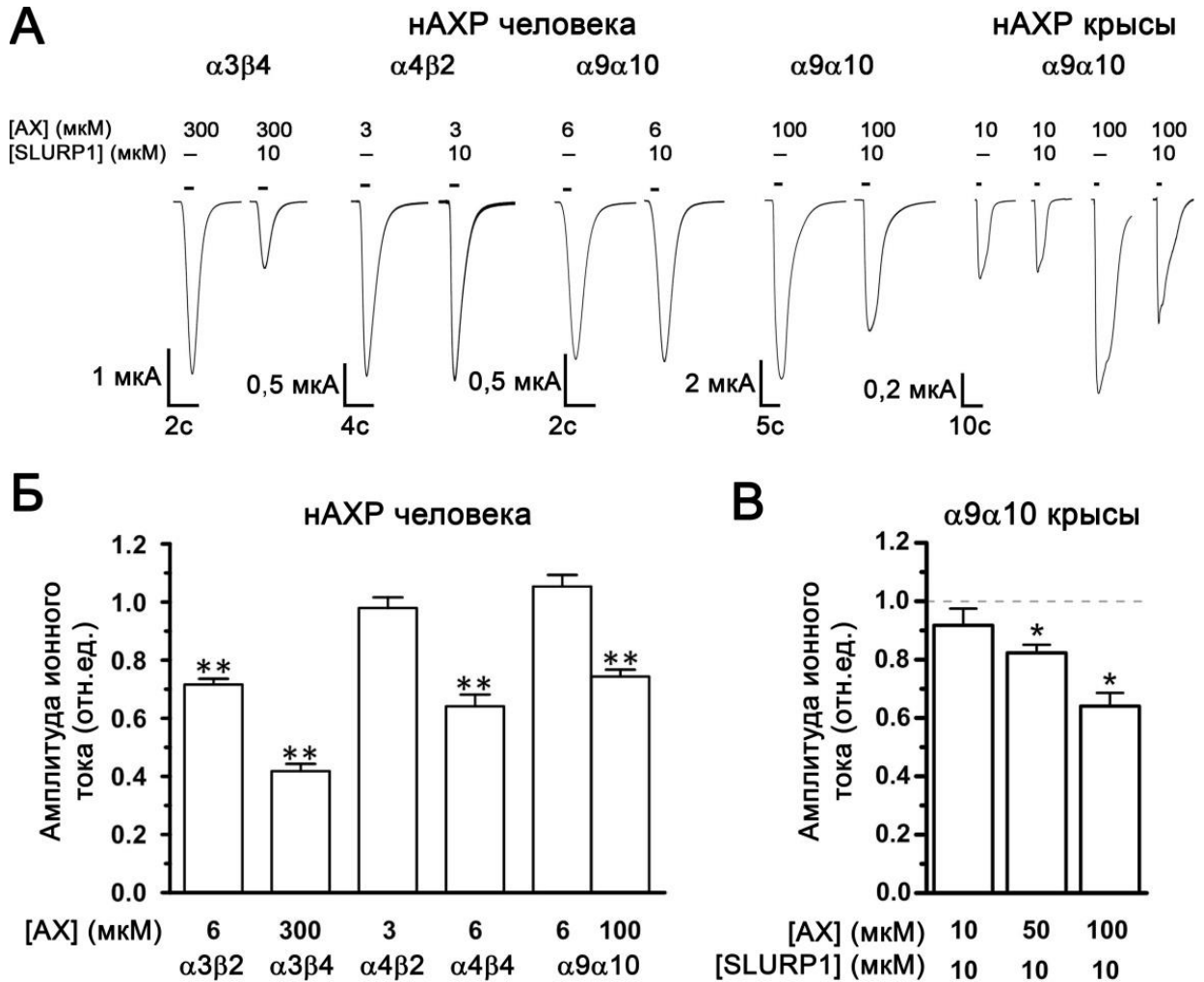


Рис. 5.13 – Ингибирующее действие синтетического белка SLURP-1 человека на гетеромерные нейрональные nAХР человека и крысы. (А) Примеры ионных токов, проходящих через $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$ и $\alpha 9\alpha 10$ nAХР при добавлении ацетилхолина (AX) в контрольных условиях и в присутствии 10 мкМ SLURP-1. **(Б)** Влияние 10 мкМ SLURP-1 на амплитуду AX (EC_{50})-индуцированных ионных токов в $\alpha 3\beta 2$ (6 мкМ), $\alpha 3\beta 4$ (300 мкМ), $\alpha 4\beta 2$ (3 мкМ), $\alpha 4\beta 4$ (6 мкМ) and $\alpha 9\alpha 10$ (6 мкМ) nAХР, экспрессированных в ооцитах шпорцевоц лягушки. **(В)** SLURP-1 (10 мкМ)-опосредованное ингибирование ионных токов в $\alpha 9\alpha 10$ nAХР зависело от используемой концентрации агониста (10 – 100 мкМ AX, $EC_{50} = 20$ мкМ). Данные приведены как среднее \pm стандартная ошибка среднего по результатам 6 – 14 независимых опытов, * $p < 0.05$, ** $p < 0.0001$, двухвыборочный t-критерий Стьюдента для независимых выборок.

Недавно еще один секретируемый представитель белков семейства Ly6, SLURP-2, был рекомбинантно экспрессирован в *E.coli* с дополнительным N-концевым остатком метионина [537]. В микромолярных концентрациях данный белок ингибировал $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$ и $\alpha 7$ nAHP, а при более низких концентрациях он активировал $\alpha 7$ nAHP-опосредованные ионные токи. В более ранней работе при использовании другой версии рекомбинантного белка SLURP-2 было показано его предпочтительное связывание с гетеромерными $\alpha 3^*$ nAHP по сравнению с гомопентамерными nAHP [538].

Таким образом, в настоящей работе впервые было установлено, что синтетический белок SLURP-1 человека с микромолярной аффинностью ингибирует гетеромерные nAHP, предпочтительно связываясь с рецепторами, содержащими $\alpha 3$ и $\beta 4$ субъединицы ($IC_{50} = 4,75 \pm 0,78$ мкМ). В отношении же $\alpha 7^*$ и $\alpha 9\alpha 10$ подтипов SLURP-1 является аллостерическим негативным модулятором.

Спектр методов, разработанных с использованием α -нейротоксинов и других специфичных лигандов nAHP как инструментов исследования, позволил далее перейти к исследованиям физиологической и патофизиологической роли nAHP.

5.4 Функциональная активность nAHP в организме. Ноцицепция.

В настоящей работе была поставлена задача разобраться в ряде мало изученных аспектов ноцицепции или рецепции боли, в которые вовлечены ацетилхолиновые рецепторы. Актуальность проблемы подчеркивается невозможностью выделения некоего единого механизма участия холинергической системы в болевой чувствительности, т.к. при проведении болевого сигнала в организме затрагивается очень большое число нервных центров, начиная от ноцицептивных клеток чувствительных ганглиев и заканчивая специфическими отделами ЦНС. Это отражается и наличием весьма противоречивой информации об обезболивающих свойствах лигандов nAHP, зависящих не только от их селективности и характера воздействия на nAHP, но и от характера боли и способа введения препарата. Дальнейшие исследования в этой области также обоснованы необходимостью разработки новых эффективных и безопасных обезболивающих средств, которые не будут вызывать привыкания, что особенно важно при хронических болях. Так, в патофизиологии мигрени внимание традиционно уделялось передаче ноцицептивной информации тройничным чувствительным нервом из оболочек головного мозга, основного места зарождения болевых сигналов [539-541], в высшие центры болевой чувствительности в головном мозге [542]. При этом практически не исследована функциональная роль иннервации данных тканей парасимпатической нервной системой,

холинергической по своей природе. Однако было показано, что аксоны нервных клеток парасимпатического основно-небного ганглия (*ganglion sphenopalatinum*) посредством высвобождения ацетилхолина могут воздействовать на чувствительные тройничные нервные волокна, расположенные вокруг сосудов в оболочках мозга [543]. Кроме того, парасимпатическая ноцицептивная активность может влиять на центральный тройнично-парасимпатический рефлекс, регулирующий кровоток в мозговых оболочках, в котором задействованы спинномозговое ядро тройничного нерва (каудальная часть, *trigeminal nucleus caudalis*) и основно-небный ганглий [544, 545]. Электростимуляция основно-небного ганглия может вызвать такие связанные с мигренью эффекты, как расширение кровеносных сосудов твердой мозговой оболочки и высвобождение из них белков плазмы крови [546]. Блокада же этого ганглия способна облегчать характерные признаки мигрени у пациентов [547]. Также известно, что карбамоилхолин, типичный агонист АХР, может провоцировать головные боли у пациентов с мигренью без ауры [548]. Этот аналог ацетилхолина является эффективным сосудорасширяющим средством в случае черепно-мозговых сосудов [549]. Кроме того, инъекция ботулинического нейротоксина типа А (Ботокс), который ингибирует экзоцитоз ацетилхолина, может локально снижать высвобождение плазмы крови из кровеносных сосудов [550], что часто наблюдается при мигрени. Все приведенные данные косвенно указывают на вероятную роль парасимпатической нервной системы и всех ее молекулярных компонентов как в ноцицепции, так и в развитии мигрени.

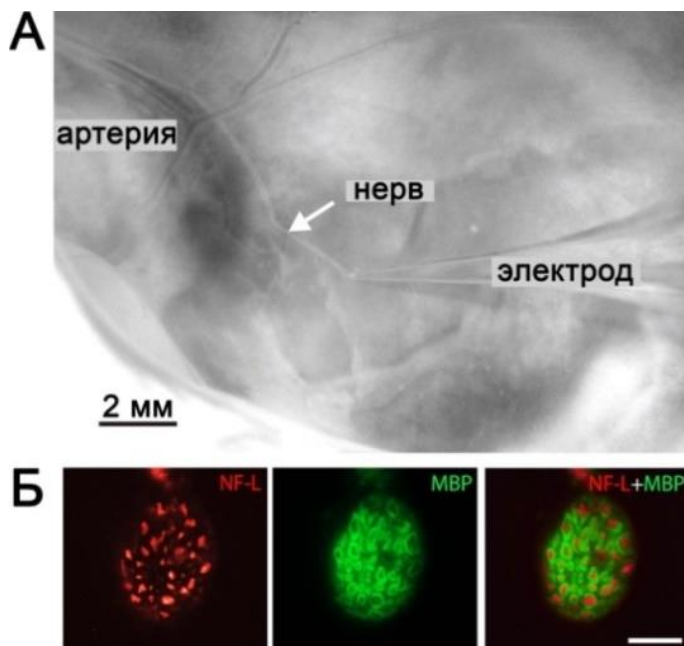


Рис. 5.14 – Экспериментальный препарат, состоящий из половины черепа крысы с интактной твердой мозговой оболочкой и иннервирующей ее ветвью тройничного нерва (*nervus spinosus*). (А) Фотография *ex vivo* препарата, подготовленного для регистрации спонтанной ноцицептивной активности в твердой мозговой оболочке. Показано типичное расположение *nervus spinosus* относительно срединной артерии оболочек мозга, а также видна его часть, помещенная внутрь микроэлектрода. (Б) Гистохимическое окрашивание поперечного среза *nervus spinosus* с помощью антител к легкому компоненту нейрофиламентов (NF-L, красный цвет) и к основному белку миелина (MBP, зеленый цвет), нейрхимическим маркерам миелинизированных нервных волокон типа А. Масштаб: 20 мкм.

В нашей работе впервые функциональная роль иннервации оболочек головного мозга холинергической нервной системой изучалась с использованием *ex vivo* препарата, состоящего из половины черепа крысы с интактной твердой мозговой оболочкой и сохранными системами иннервации (Рис. 5.14). Для изучения спонтанной ноцицептивной активности ветви тройничного нерва, иннервирующей твердую мозговую оболочку (*nervus spinosus*), она была освобождена от окружающей соединительной ткани и помещена в стеклянный регистрирующий микроэлектрод (Рис. 5.14А). Таким образом, мы могли отслеживать возникновение потенциалов действия, генерируемых нервными окончаниями в оболочках мозга и передаваемых по *nervus spinosus*. Для более детальной характеристики изучаемого нерва было проведено гистохимическое окрашивание его поперечных срезов антителами к маркерам различных нервных волокон: нейрофиламентам (Рис. 5.14 Б, NF-L, *красный цвет*), основному белку миелина (Рис. 5.14Б, MBP, *зеленый цвет*), бета-тубулину, температурно-чувствительным рецепторам TRPV1 и TRPA1, P2X3 и др. (данные не приведены). Нейрофиламенты и основной белок миелина являются известными нейрхимическими маркерами миелинизированных волокон [551, 552]. Проведенное гистохимическое исследование впервые выявило 50 – 150 миелинизированных волокон типа А с диаметром 1 – 10 мкм в составе набора образцов *nervus spinosus*. Остальные белковые маркеры позволили оценить количество немиелинизированных нервных волокон типа С в этом нерве примерно в таком же диапазоне.

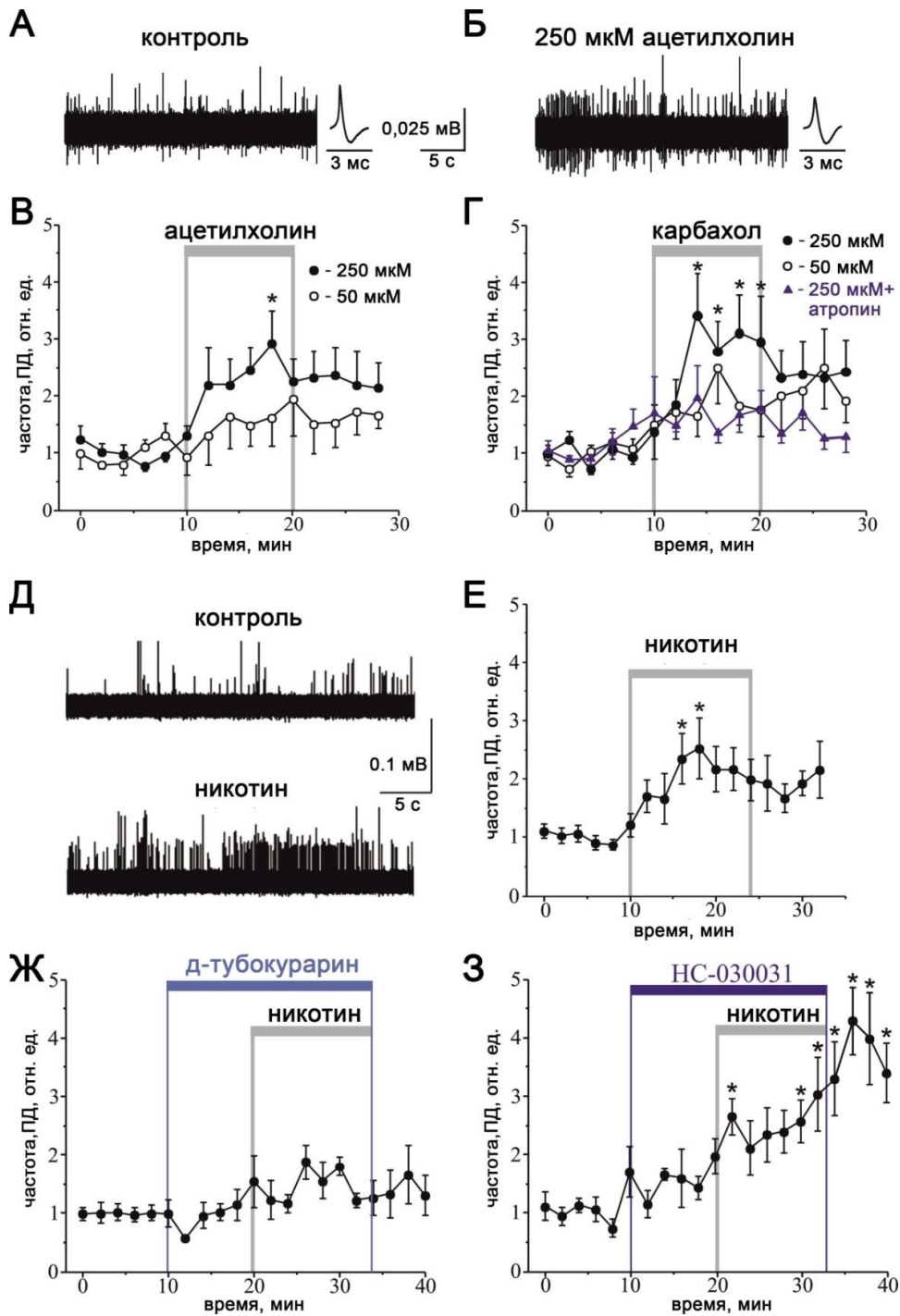


Рис. 5.15 – Про-ноцицептивное действие холинергических агонистов (ацетилхолина (АХ), карбамоилхолина и никотина), оказываемое на *ex vivo* препарат оболочек головного мозга крысы. (А) Примеры спонтанной ноцицептивной электрической активности и усредненной формы потенциалов действия, регистрируемых в *nervus spinosus* мозговых оболочек в контрольных условиях и (Б) при воздействии 250 мкМ АХ. (В) Повышение частоты ноцицептивных потенциалов действия (ПД) при добавлении 50 и 250 мкМ АХ, регистрируемых в *nervus spinosus*. (Г) Повышение частоты ноцицептивных ПД при добавлении 50 и 250 мкМ карбамоилхолина (карбахола), регистрируемых в *nervus spinosus*, и отсутствие этого эффекта при воздействии холинергического антагониста 1 мкМ атропина. (Д) Примеры спонтанной ноцицептивной электрической активности, регистрируемой в *nervus spinosus* мозговых оболочек в контрольных условиях и при воздействии 100 мкМ АХ. (Е) Повышение частоты ноцицептивных ПД при добавлении

100 мкМ никотина, регистрируемых в *nervus spinosus*. **(Ж)** Отсутствие этого эффекта при воздействии 50 мкМ *d*-тубокурарина, антагониста нАХР, **(З)** но не 25 мкМ НС 030031, антагониста TRPA1 рецепторов. Каждая временная точка отражает среднюю нормализованную частоту ПД за 2 мин регистрации. Приведены результаты 6 – 10 независимых экспериментов, показаны средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($*p < 0.05$, дисперсионный анализ для повторных измерений (one way repeated measures ANOVA, Tukey test).

В контрольных условиях мы наблюдали относительно невысокую ноцицептивную активность *nervus spinosus*, которая могла быть усилена путем добавления растворов холинергических лигандов на твердую мозговую оболочку (Рис. 5.15). Так, ацетилхолин (250 мкМ) значительно повышал частоту регистрируемых потенциалов действия (ПД, Рис. 5.15А-В) в среднем в 2,5 раза за 10 мин инкубации (Рис. 5.15В, $n = 6$, $p < 0,05$). Более низкая (50 мкМ) концентрация ацетилхолина также повышала частоту ПД, но эффект был статически не достоверен (Рис. 5.15В, $n = 6$, $p > 0,05$). Таким образом, впервые было обнаружено проноцицептивное действие агониста АХР, оказываемое на оболочки головного мозга.

5.4.1 Подтипы ацетилхолиновых рецепторов в мозговых оболочках

Поскольку ацетилхолин (эндогенный агонист как мускариновых (мАХР), так и никотиновых АХР), быстро разрушается в живых тканях, на следующем этапе мы проверили, будет ли вызывать такой же по интенсивности ответ карбамоилхолин, стабильный холинергический агонист. Стоит отметить, что карбамоилхолин предпочтительно активировал мАХР являясь их более высокоаффинным агонистом по сравнению с нАХР [553-556]. Подобно низким дозам АХ, 50 мкМ карбамоилхолин продемонстрировал явную тенденцию к повышению частоты ПД, но эффект оказался статистически не достоверен (Рис. 5.15Г, $n = 10$, $p > 0,05$). Однако 250 мкМ карбамоилхолин вызывал значительное увеличение в количестве наблюдаемых ПД уже после 5 мин применения, таким образом, он оказался даже более эффективным, чем АХ. Про-ноцицептивная активность карбамоилхолина в существенной степени подавлялась атропином (1 мкМ), антагонистом мАХР (Рис. 5.15В, $n=7$).

При добавлении карбамоилхолина роль нАХР можем быть замаскирована активацией ряда подтипов мАХР, которые зачастую обладают противоположным действием на нервную передачу ноцицептивных сигналов [557-559]. Для прямой оценки вклада нАХР в ноцицептивную активность оболочек мозга был использован их специфический агонист никотин. Никотин (100 мкМ) вызывал интенсивное и длительное

усиление частоты ПД в *nervus spinosus* (Рис. 5.15Д), пик активности приходился на 8 – 10 мин инкубации (Рис. 5.15Е, $n = 8$, $p < 0.05$). Участие нАХР в наблюдающемся эффекте было подтверждено преинкубацией с 50 мкМ *d*-тубокурарином, известным блокатором никотиновых рецепторов, который предотвращал последующее действие никотина (Рис. 5.15Ж). В ряде работ TRPA1 рецепторы, известные своей чувствительностью к ряду ноцицептивных стимулов, также рассматривались как молекулярные мишени для действия никотина [560, 561]. Однако в наших опытах специфический блокатор данного подтипа рецептора, HS-030031 (25 мкМ), не оказывал заметного влияния на последующее действие никотина (Рис. 5.15З).

Проведенные эксперименты впервые продемонстрировали, что активация мАХР и нАХР в оболочках головного мозга посредством их специфических агонистов – карбамоилхолина и никотина, вызывает достоверное увеличение частоты болевых сигналов в 2,5-3,5 раза, которые регистрировались в чувствительной ветви тройничного нерва (*nervus spinosus*). Наблюдаемое проноцицептивное действие превосходило эффект АХ, вероятно, из-за его быстрой деградации, в условиях *ex vivo* системы.

5.4.2 Эндогенная холинергическая система мозговых оболочек

Важным компонентом эндогенной холинергической нервной системы являются ферменты ацетилхолин- и бутирилхолинэстераза (АChE и BuChE, соответственно), обеспечивающие метаболизм АХ. Мы продемонстрировали их наличие в нервных волокнах твердой мозговой оболочки, окружающих кровеносные сосуды, а также в более редких случаях в отдельных аксонах, расположенных диффузно (Рис. 5.16А, Б)¹¹. Среди иммунопозитивных волокон встречались как тонкие немиелинизированные, так и большие по диаметру миелинизированные аксоны, которые определялись по положительному гистохимическому окрашиванию антителами к нейрофиламентам NF-H (Рис. 5.16А, Б). Выявленная локализация обоих ферментов предполагает их участие в контроле АХ-опосредованной передачи нервных сигналов в твердой мозговой оболочке.

¹¹ Совместно с акад. РАН Никольским Е.Е. и к.б.н. Нуруллиным Л., Казанский Федеральный Университет, г. Казань

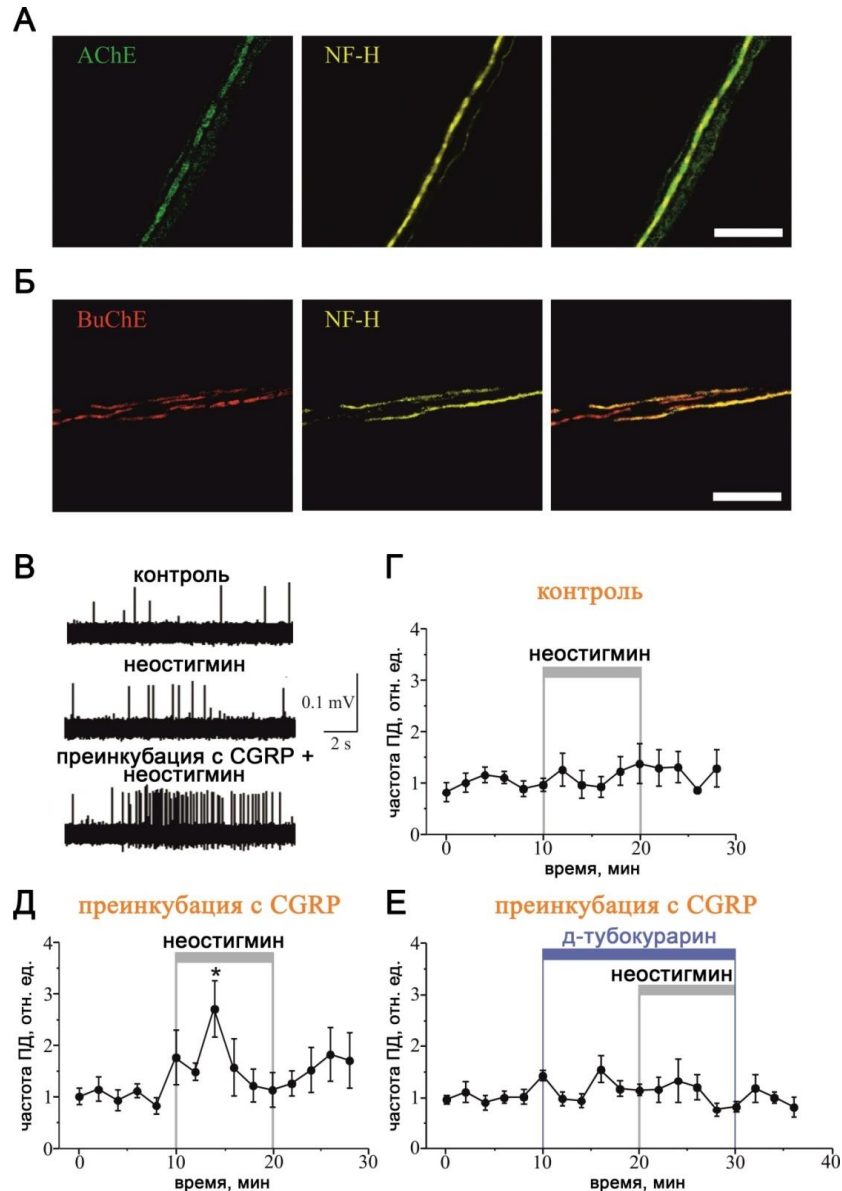


Рис. 5.16 – Холинергическая система мозговых оболочек крысы способна усиливать ноцицептивную активность афферентных нервных волокон *nervus spinosus*, ветви тройничного нерва. Иммуногистохимическое окрашивание (А) ацетилхолинэстеразы (AChE, зеленый цвет) и (Б) бутирилхолинэстеразы (BuChE, красный цвет) в нервных волокнах, окружающих кровеносные сосуды твердой мозговой оболочки. Показана колокализация с нейрофиламентами ((NF-H, neurofilament heavy chain, желтый цвет), нейрохимическим маркером миелинизированных нервных волокон крупного диаметра. Масштаб 40 мкм. (В) Примеры спонтанной ноцицептивной электрической активности, регистрируемые в *nervus spinosus* мозговых оболочек в контрольных условиях и при воздействии 12,5 мкМ неостигмина, ингибитора ацетилхолинэстеразы. При добавлении неостигмина частота регистрируемых ПД (Г) оставалась неизменной в контрольных физиологических условиях и (Д) возрастала после двухчасовой преинкубации препарата с пептидом CGRP (calcitonin gene-related peptide, 1 мкМ), провоспалительным агентом и медиатором мигренозных болей. (Е) Данный эффект не наблюдался после применения 50 мкМ *d*-тубокурарина, антагониста НАХР. Каждая временная точка отражает среднюю нормализованную частоту ПД за 2 мин регистрации. Приведены результаты 5 – 7 независимых экспериментов, показаны средние значения \pm стандартная ошибка среднего (* $p < 0.05$, дисперсионный анализ для повторных измерений (one way repeated measures ANOVA, Tukey test).

Применение классического ингибитора холинэстеразной активности неостигмина (12,5 мкМ) позволило подтвердить функциональную активность обнаруженных ферментов и участие выделяющегося эндогенного АХ в регуляции ноцицептивной активности в мозговых оболочках (Рис. 5.16В – Е). В контрольных условиях этот блокатор не оказывал влияния на спонтанную ноцицептивную электрическую активность *nervus spinosus* (Рис. 5.16В, Г, $n = 5$, $p > 0,05$). Однако он вызывал значительное усиление ноцицептивной сигнализации после двухчасовой преинкубации изучаемого препарата с нейропептидом CGRP (calcitonin gene-related peptide, 1 мкМ), известным провоспалительным агентом и основным медиатором мигренозных болей (Рис. 5.16В, Д, $n = 7$, $p < 0,05$). В этом случае количество генерируемых ПД за 6 минут возрастало в 2,7 раза. Базовый уровень спонтанной ноцицептивной активности *nervus spinosus* не изменялся при воздействии 1 мкМ CGRP: в среднем за 10 минут было зарегистрировано 372 ± 124 ПД, тогда как в контроле эта цифра составляла 385 ± 75 ПД (среднее \pm стандартное отклонение, $n = 12$, $p > 0,05$).

Важно отметить, что совместное применение 50 мкМ *d*-тубокурарина, неселективного антагониста nAChR, предотвращало наблюдаемый эффект неостигмина (Рис. 5.16Е, $n = 5$, $p < 0,05$), что указывает на основную роль этих рецепторов в механизме про-ноцицептивного действия эндогенного ацетилхолина. Таким образом, впервые установлено, что в условиях экспериментальной модели мигрени [562], вызванной пептидом CGRP в *ex vivo* препарате оболочек мозга, эндогенный АХ способен оказывать проноцицептивное действие, что может указывать на важность холинергической нервной передачи при данной патологии.

5.4.3 Клеточные мишени действия эндогенного АХ. Сенсорные нейроны тройничного ганглия

На следующем этапе работы были изучены клеточные и молекулярные мишени действия АХ в мозговых оболочках, а также их ближайшие аналоги в других органах. Полученные электрофизиологические данные позволяют полагать, что агонисты АChR в мозговых оболочках могут непосредственно воздействовать на нервные окончания афферентных нейронов, что подтверждается данными предыдущих исследований об активирующей способности никотина в отношении ноцицептивных нервных окончаний кожи и эпителия носовой полости [563-567]. В настоящей работе были исследованы наличие и функциональная активность ацетилхолиновых рецепторов в афферентных нейронах сенсорных ганглиев, аккумулирующих чувствительную информацию из

мозговых оболочек мозга (нейроны тройничного ганглия) и других периферических органов и тканей (нейроны спинномозговых ганглиев). Для этой цели был использован метод кальциевого имиджинга, позволяющий детектировать реакцию афферентных нейронов в первичной культуре на воздействие различных холинергических агентов, а также было применено цито- и гистохимическое окрашивание как первичной нейрональной культуры, так и срезов сенсорных ганглиев с использованием специфических лигандов АХР и известных нейрхимических маркеров.

Хотя первичные афферентные нейроны весьма гетерогенны по чувствительности к различным стимулам, их можно разделить на две основные группы: ноцицепторы, воспринимающие болевые раздражители, и механорецепторы, реагирующие на механическое воздействие [551, 568]. Первые отличаются небольшим диаметром тел и аксонов, которые чаще не миелинизированы (тип С) или слабо миелинизированы (тип Аδ), и могут быть выявлены по чувствительности к капсаицину и экспрессии его рецептора TRPV1, а также нейропептида CGRP (пептидергические ноцицепторы) и по связыванию изолектина В4 (непептидергические ноцицепторы). Механорецепторы крупнее, обладают миелинизированными аксонами типа А и в основном идентифицируются по экспрессии нейрофиламентов.

В исследовании, проведенном на первичной культуре нейронов тройничного ганглия¹², применялись растворы никотина (100 мкМ) и карбамоилхолина (50 мкМ) для преимущественной активации nАХР и mAХР, соответственно (Рис. 5.17А-Д). Использование 50 мМ КСl по окончании протокола позволяло нам подтвердить нейрональную природу исследуемых клеток [569], а добавление капсаицина (200 нМ) выявляло среди них ноцицептивные нейроны, экспрессирующие один из основных рецепторов болевых стимулов TRPV1 [570] (Рис. 5.17А, Б). Примерно 60% нейронов тройничного ганглия в культуре экспрессируют TRPV1 рецептор [569]. Большинство этих клеток являются некрупными немиелинизированными нейрофиламент-отрицательными нейронами (Рис. 5.17Е). В проведенных функциональных тестах около трети нейронов тройничного ганглия (34%, 56 из 163 клеток) были капсаицин-чувствительными ноцицептивными клетками (Рис. 5.17А, Б), часть из них также реагировала на добавление никотина (Рис. 5.17А, 12 из 56 клеток).

¹² Совместно с проф. Гиниатуллиным Р.А. и его сотрудниками Абушик П., Михайловым Н. и к.м.н. Гиниатуллиной Р., Институт молекулярных исследований имени А.И. Виртанена Университета Восточной Финляндии, Финляндия

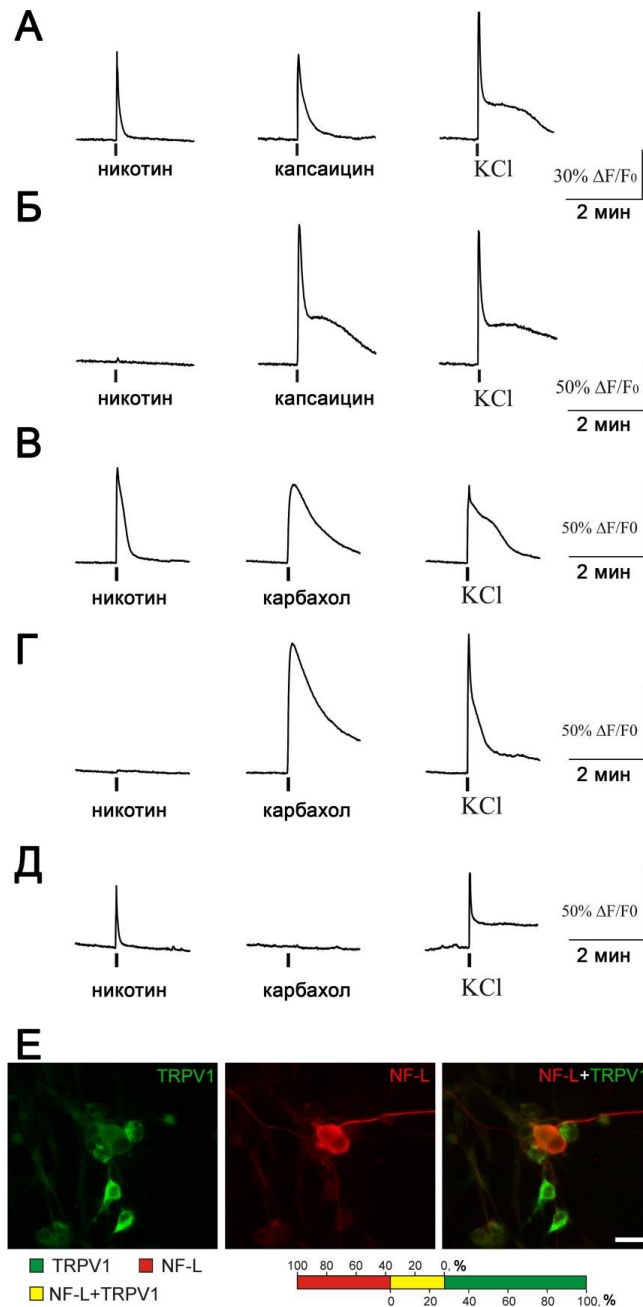


Рис. 5.17 – Функциональная экспрессия nAHR и mAHR первичными афферентными нейронами тройничного ганглия крысы. (А -Д) Примеры резкого повышения внутриклеточной концентрации ионов кальция в ответ на последовательные добавления 100 μ М никотина, 50 μ М карбамоилхолина, 200 нМ капсаицина и 50 мМ КСl, измеренного методом кальциевого имиджинга в первичной культуре нейронов тройничного ганглия. Показаны (А) чувствительный и (Б) не чувствительный к никотину ноцицептивные нейроны. Также представлены нейроны, которые (В) совместно экспрессируют nAHR и mAHR, а также исключительно (Г) mAHR или (Д) nAHR. (Е) Двойное иммуноцитохимическое окрашивание первичной культуры нейронов тройничного ганглия антителами к рецептору TRPV1 (зеленый цвет) и нейрофиламентам (NF-L, красный цвет), маркеру миелинизированных нервных волокон. Масштаб: 20 μ м.

В общей клеточной популяции тройничного ганглия почти половина нервных клеток демонстрировала быстрый кальциевый ответ на воздействие никотина (43%, 70 из 163

клеток). Добавление карбамоилхолина приводило к повышению внутриклеточной концентрации ионов кальция в 71% нейронов (Рис. 5.17В-Д, 82 из 116 клеток), причем 70% этих клеток также реагировали на воздействие никотина (Рис. 5.17В). Таким образом, клеточная популяция, экспрессирующая mAХР и nAХР оказалась смешанной, были обнаружены клетки, экспрессирующие рецепторы обоих видов, а также несущие исключительно никотиновые или мускариновые АХР (Рис. 5.17В-Д). Стоит отметить, что никотиновые АХР, распространенные в афферентных нейронах, имеют разнообразную субъединичную композицию [571]. Так, на уровне мРНК экспрессируются все субъединицы nAХР, но основными подтипами рецепторов являются $\alpha 7$, $\alpha 3\beta 4$ и $\alpha 6\beta 4$ [572-577]. Также ранее была показана функциональная экспрессия метаботропных мускариновых АХР данными нейронами, отмечалось присутствие M2, M3 и M4 подтипов рецепторов [559, 565, 578, 579]. Однако в отличие от nAХР, которые усиливают чувствительную нервную передачу [563, 580], активация мускариновых рецепторов может также приводить и к ингибиторному эффекту как на периферии [543, 559, 565], так и в спинном мозге [581]. Таким образом, продемонстрировано, что функциональные mAХР экспрессирует большинство (71%) чувствительных нейронов тройничного ганглия, а функциональные nAХР – примерно половина нейронов (43%), часть которых являются ноцицепторами – потенциальными клеточными мишенями проноцицептивного действия эндогенного АХ в оболочках головного мозга. Суммарный эффект активации ацетилхолиновых рецепторов на конкретной нервной клетке зависит от их субъединичного состава и плотности расположения.

5.4.4 Клеточные мишени действия эндогенного АХ. Сенсорные нейроны спинномозгового ганглия

Аналогичное исследование методами кальциевого имиджинга и гистохимии было проведено с использованием сходного объекта – первичных афферентных нейронов спинномозговых чувствительных ганглиев, которые, также как и тройничный ганглий, ответственны за восприятие сенсорной информации в различных частях тела и ее передачу в ЦНС. Так же как опыты с нейронами тройничного ганглия, эксперимент по кальциевому имиджингу с первичной культурой спинномозговых ганглиев включал от одного до трех последовательных добавлений лигандов nAХР с последующей подачей капсаицина (500 нМ), выявляющей ноцицептивные нейроны (нервные волокна С- и Ad-типов) [582-584], а завершался добавлением хлорида калия в высокой концентрации (50 мМ) для подтверждения возбудимости исследуемых клеток.

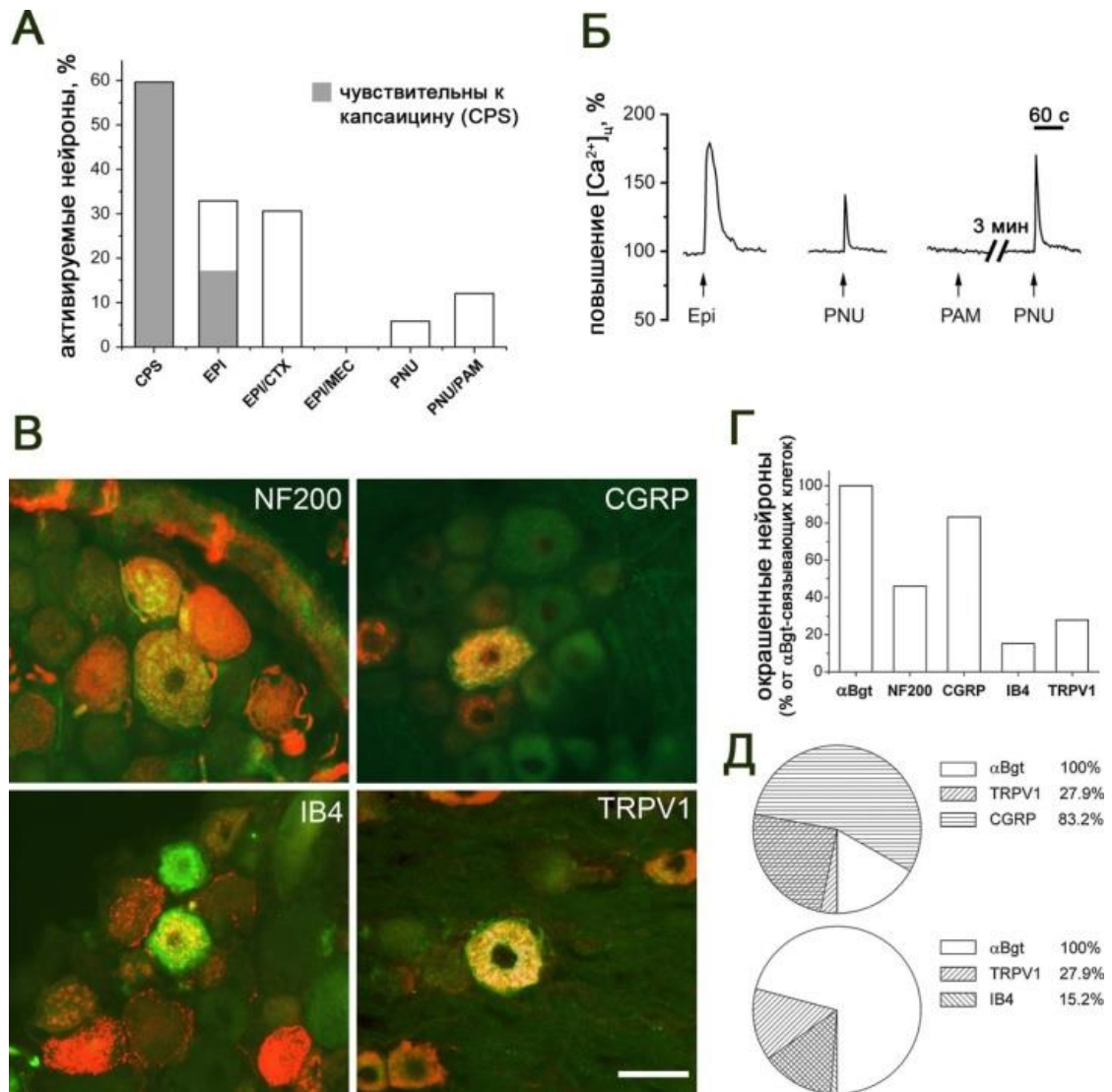


Рис. 5.18 – Функциональная экспрессия nAHR первичными афферентными нейронами спинномозговых ганглиев крысы. (А-Б) Добавление неселективного агониста nAHR эписбатидина (EPI, 10^{-5} M) и $\alpha 7$ nAHR-специфического лиганда PNU282987 (PNU, 10^{-6} M) приводило к резкому повышению внутриклеточной концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]_{in}$). Эффект агониста PNU282987 усиливался при использовании положительного аллостерического модулятора PNU120596 (PAM, 10^{-6} M). Антагонисты мекамиламин (MES, 10^{-4} M) и CTX (10^{-6} M) полностью подавляли ионный ток во всех nAHR и в $\alpha 7$ nAHR, соответственно. Добавление капсаицина (CPS, 0,5 мкM) позволяло выявлять ноцицептивные нейроны среди реагирующих на лиганды nAHR. (А) Процентное содержание реагирующих нейронов в общей клеточной популяции, (Б) примеры клеточных кальциевых ответов. (В) Гистохимическое окрашивание криостатных срезов спинномозговых ганглиев с использованием 12,5 нM Alexa Fluor 488- α Bgt (зеленый цвет) и антител к нейрохимическим маркерам различных подтипов нейронов (красный цвет): к 200 кДа компоненту нейрофиламентов (NF200), нейропептиду CGRP и капсаицин-чувствительному рецептору TRPV1, также был применен биотинилированный изолектин (IB4). (Г-Д) Гистограммы отражают процент нейронов, экспрессирующих $\alpha 7$ nAHR и окрашенных флуоресцентным α Bgt, которые были иммуноположительных к одному или нескольким исследуемым маркерам. Приведены результаты 4-10 независимых экспериментов. Масштаб: 40 мкм.

В результате проведенных экспериментов было выявлено, что неселективный агонист nAHP эписбатидин (10^{-5} М) индуцировал кальциевый ответ в 33% (280 из 851 клеток, $n = 18$) спинномозговых нейронов, половина из которых были представлены ноцицептивными капсаицин-чувствительными клетками (55%, 154 из 280 клеток, $n = 18$) (Рис. 5.18А, Б). В подтверждении специфичности наблюдаемой реакции, она полностью подавлялась с помощью мекамиламина (10^{-4} М), антагониста нейрональных nAHP (Рис. 5.18А, 0 из 204 клеток, $n = 4$).

Чтобы охарактеризовать долю гомо- и гетеропентамерных nAHP, ответственных за реакцию на эписбатидин, был использован антагонист $\alpha 7$ - и $\alpha 9$ -содержащих рецепторов α -кобратоксин (СТХ, 10^{-6} М). При его использовании эписбатидин повышал внутриклеточную концентрацию кальция в 30,6% нейронов (Рис. 5.18А, 139 из 454 клеток, $n = 9$). Стоит отметить, что исследование с использованием тканей нокаутных по гену $\alpha 7$ nAHP мышей показали, что наблюдаемое связывание α -бунгаротоксина и α -кобратоксина в спинномозговых ганглиях осуществляется именно с этим подтипом рецептора (Рис. 5.2), хотя в литературе имеются указания на экспрессию в них $\alpha 9$ -содержащих nAHP на уровне мРНК [327]. Таким образом, результаты кальциевого имиджинга показывают, что индивидуально $\alpha 7$ nAHP экспрессируются в очень малом числе клеток (2,4% всей популяции) и для более детализированного исследования экспрессии рецепторов этого подтипа был применен их специфический агонист PNU282987 (10^{-6} М) [390].

В результате мы наблюдали целевую активацию $\alpha 7$ nAHP в 5,8% культивируемых нейронов спинномозговых ганглиев (Рис. 5.18А, Б, 31 из 537 клеток, $n = 13$). Данный клеточный ответ можно было усилить путем предварительной обработки клеточной культуры $\alpha 7$ nAHP-специфическим положительным аллостерическим модулятором PNU120596 (10^{-6} М, Рис. 5.18Б), который не способен инициировать открытие никотинового канала, но уменьшает его скорость десенситизации и увеличивает амплитуду вызываемых агонистом ионных токов [286]. В этих условиях 12% нейронов (Рис. 5.18А, Б, 30 из 249 клеток, $n = 6$) становились чувствительны к воздействию агониста PNU282987 (10^{-6} М), причем большинство из них также реагировали на последующее добавление капсаицина (23 из 30 клеток, $n = 6$). Таким образом, большинство нейронов, способных демонстрировать кальциевый ответ на добавление эписбатидина содержали гетеропентамерные nAHP, состоящие из сочетания α и β субъединиц, иногда в совокупности с гомопентамерными $\alpha 7$ nAHP.

Стоит также отметить, что амплитуда и длительность ответов, вызванных эписбатидином, значительно варьировали, указывая на вовлеченность нескольких

подтипов nAHP и различных внутриклеточных механизмов усиления первоначального кальциевого сигнала [585, 586]. PNU282987-индуцированные клеточные ответы отличались большей резкостью и меньшей длительностью как при использовании положительного модулятора, так и в его отсутствие (Рис. 5.18Б), что типично для быстро десенситизируемых $\alpha 7$ nAHP. Таким образом, впервые показана экспрессия функционально-активных $\alpha 7$ nAHP наряду с гетеропентамерными подтипами рецепторов в 12% нейронов спинномозговых ганглиев, в основном ноцицептивных по характеру воспринимаемых стимулов.

5.4.5 Нейрохимический профиль сенсорных нейронов, экспрессирующих $\alpha 7$ nAHP

Для детальной характеристики нейрохимического профиля нейронов, экспрессирующих $\alpha 7$ nAHP, было проведено гистохимическое окрашивание срезов спинномозговых ганглиев с помощью флуоресцентно-меченого α -бунгаротоксина (Alexa Fluor 488- α Bgt) и набора коммерчески доступных антител к маркерам определенных подтипов сенсорных нейронов (TRPV1, CGRP, NF и др). α Bgt выявил $\alpha 7$ nAHP, расположенные как на поверхности клеток, так и внутри, где рецепторы проходят ряд стадий формирования активного рецептора (Рис. 5.18В). Окраска антителами к цитоплазматическому нейрональному белку PGP 9.5 (Thompson et al., 1983), подтвердила наличие $\alpha 7$ nAHP исключительно на нейронах, но не на глиальных сателлитных клетках, которые плотно выстилают промежутки между нервными клетками в ганглии.

Нейроны, экспрессирующие $\alpha 7$ nAHP (8,5% (218 из 2553 клеток, n = 5)), оказались в среднем на 5 мкм чуть более крупными, чем основная масса нервных клеток спинномозговых ганглиев. Среди них преобладали нейроны среднего диаметра, хотя встречались клетки всех представленных в популяции размеров за исключением самых маленьких (до 20 мкм в диаметре).

Последующие эксперименты по двойному гистохимическому окрашиванию показали, что почти половина (46%, 287 из 624 клеток, n = 6, Рис. 5.18В, Г) α Bgt-положительных клеток содержала нейрофиламенты, т.е. была представлена средними и крупными нейронами с миелинизированными аксонами А-типа. Для более подробной характеристики второй половины α Bgt-связывающих нейронов использовали известные маркеры двух основных классов ноцицепторов: пептидергических

(иммуноположительных к пептиду CGRP (calcitonin gene-related peptide)) и непептидергических (связывающих IB4 (isolectin B4)) нейронов [551, 568, 587, 588]. Подавляющее большинство первичных афферентных нейронов, экспрессирующих $\alpha 7$ nAHP, оказались пептидергическими (83%, 459 из 552 клеток, $n = 6$, Рис. 5.18В-Д). И только небольшая фракция (15%, 127 из 838 клеток, $n = 6$, Рис. 5.18В, Г) была непептидергической природы.

Дополнительно была исследована совместная экспрессия $\alpha 7$ nAHP с известным рецептором болевых стимулов TRPV1 [582, 589, 590]. Этот рецептор экспрессируется ноцицептивными нейронами как С-, так и Ад-типов [582, 583, 591]: его обнаруживали в 49,2–59 % малых и средних пептидергических нейронов и в 50–67 % малых непептидергических клеток в спинномозговых ганглиях крыс [510, 592]. В наших условиях 64,8 % (362 из 559 клеток, 15–42 мкм в диаметре, $n = 4$) пептидергических и 61,2 % (336 из 549 клеток, 14–40 мкм в диаметре, $n = 4$) непептидергических нейронов содержали TRPV1. Только треть α Bgt-положительных нейронов (28%, 347 из 1242 клеток, $n = 10$, Рис. 5.18В-Г) продемонстрировали окрашивание антителами к TRPV1. При этом практически все $\alpha 7$ nAHP-экспрессирующие непептидергические (связывающие IB4) нейроны (92%, 105 из 114 клеток, $n = 5$) и треть пептидергических (CGRP-иммуноположительных, 29,7%, 77 из 259 клеток, $n = 4$) содержали рецепторы TRPV1 (Рис. 5.18В-Д). В результате проведенных экспериментов впервые было установлено, что $\alpha 7$ nAHP предпочтительно экспрессируется пептидергическими ноцицепторами (83%), треть которых также содержат капсаицин-чувствительный рецептор TRPV1.

5.4.6 Аксональная локализация и транспорт $\alpha 7$ nAHP в сенсорных нейронах

Основной функцией тел первичных афферентных нейронов является синтез веществ для нужд длинных аксонов, которые непосредственно участвуют в восприятии стимулов на периферии и передаче нервных сигналов в ЦНС. В связи с этим задачей следующего этапа стало исследование транспорта $\alpha 7$ nAHP в аксонах первичных афферентных нейронов. В некоторых препаратах срезов спинномозговых ганглиев крысы наблюдались окрашенные нервные волокна, в основном в месте отхождения спинномозгового нерва или дорсального корешка спинного мозга. Чтобы обогатить эти препараты $\alpha 7$ nAHP и показать направленный аксональный транспорт этих рецепторов был проведен эксперимент по пережатию спинномозгового и седалищного нервов, а также заднего и переднего корешков спинного мозга *ex vivo*.

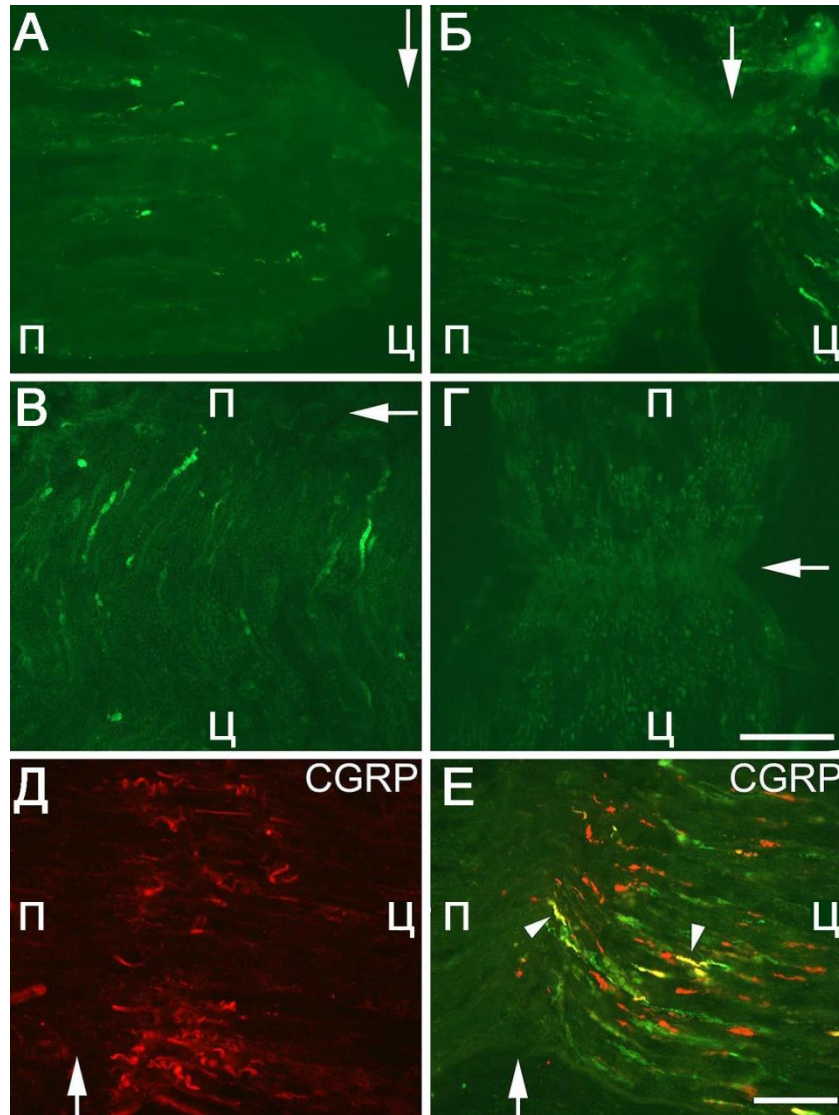


Рис. 5.19 – Остановка аксонального транспорта и накопление $\alpha 7$ nAХР (связывание Alexa Fluor 488- α Bgt, зеленый цвет) в месте пережатия нервов: (А) заднего корешка спинного мозга, (Б, Д, Е) спинномозгового нерва, (В) седалищного нерва и (Г) переднего корешка спинного мозга. Места пережатия обозначены стрелками. П-периферическая часть, Ц- центральная часть нервов относительно места пережатия. (Д, Е) Нейропептид CGRP (красный цвет) транспортируется антероградно совместно с $\alpha 7$ nAХР (зеленый цвет) в спинномозговом нерве. Совместный транспорт можно видеть в ряде волокон (стрелки, желтый цвет). Масштаб: 40 мкм.

После нескольких часов инкубации препаратов в вентилируемом буферном растворе можно было наблюдать накопление $\alpha 7$ nAХР в месте пережатия обоих нервов и заднего, но не переднего корешков спинного мозга (Рис. 5.19). Полученные результаты говорят о направленном антероградном (от тела нейрона к нервному окончанию аксона) транспорте $\alpha 7$ nAХР как в центральной (задний корешок, Рис. 5.19А), так и в периферической (спинномозговой и седалищный нервы, Рис. 5.19Б, В) частях аксонов первичных афферентных нейронов.

Стоит также отметить, что помимо явного антероградного наблюдался слабый ретроградный аксональный транспорт $\alpha 7$ nAHP в исследуемых препаратах (Рис. 5.19А-В). Отсутствие окраски переднего корешка (Рис. 5.19Г), который состоит из эфферентных аксонов мотонейронов, входящих также в состав обоих исследуемых нервов, свидетельствует о выявлении $\alpha 7$ nAHP исключительно в афферентных нервных волокнах (Рис. 5.19). При этом гистохимическое окрашивание антителами к CGRP тех же срезов переднего корешка спинного мозга выявляло вполне функциональный антероградный транспорт этого пептида, демонстрируя нормальную физиологическую активность аксонов эфферентных мотонейронов в препарате [593, 594].

Двойное гистохимическое окрашивание срезов заднего корешка спинного мозга, спинномозгового и седалищного нервов флуоресцентным α Bgt и антителами к CGRP впервые выявило совместный антероградный аксональный транспорт $\alpha 7$ nAHP и данного пептида первичными афферентными нейронами (Рис. 5.19Д, Е). Эти данные хорошо согласуются с ранее полученными результатами о предпочтительной экспрессии $\alpha 7$ nAHP в нейронах пептидергической природы (Рис. 5.18В-Д).

5.4.7 Выброс CGRP сенсорными нейронами

Известно, что пептид CGRP является одним из основных медиаторов мигренозных болей [595]. В представленной работе после сенситизации *ex vivo* препарата оболочек головного мозга с помощью 1 мкМ CGRP замечено значительное усиление ноцицептивной активности сенсорного тройничного нерва в ответ на воздействие эндогенного ацетилхолина (Рис. 5.16Д, Е). Также показана колокализация пептида CGRP и $\alpha 7$ nAHP (Рис. 5.18В-Д) и их совместный аксональный транспорт (Рис. 5.19Д, Е) в пептидергических ноцицептивных нейронах. В связи с имеющимися результатами на данном этапе работы была проверена способность агонистов nAHP вызывать или модулировать выброс пептида CGRP первичными афферентными нейронами в двух тест-системах: целых спинномозговых ганглиях крыс и выделенной первичной культуре нейронов этих ганглиев.

Специфичность используемого иммунохимического теста для количественного анализа содержания пептида CGRP была подтверждена с использованием спинномозговых ганглиев мышей, нокаутных по соответствующему гену. В экстракте одного спинномозгового ганглия нормальных мышей в среднем детектировали $101,3 \pm 0,5$ пг пептида CGRP, в то время как в нокаутных тканях уровень детекции не превышал фонового уровня.

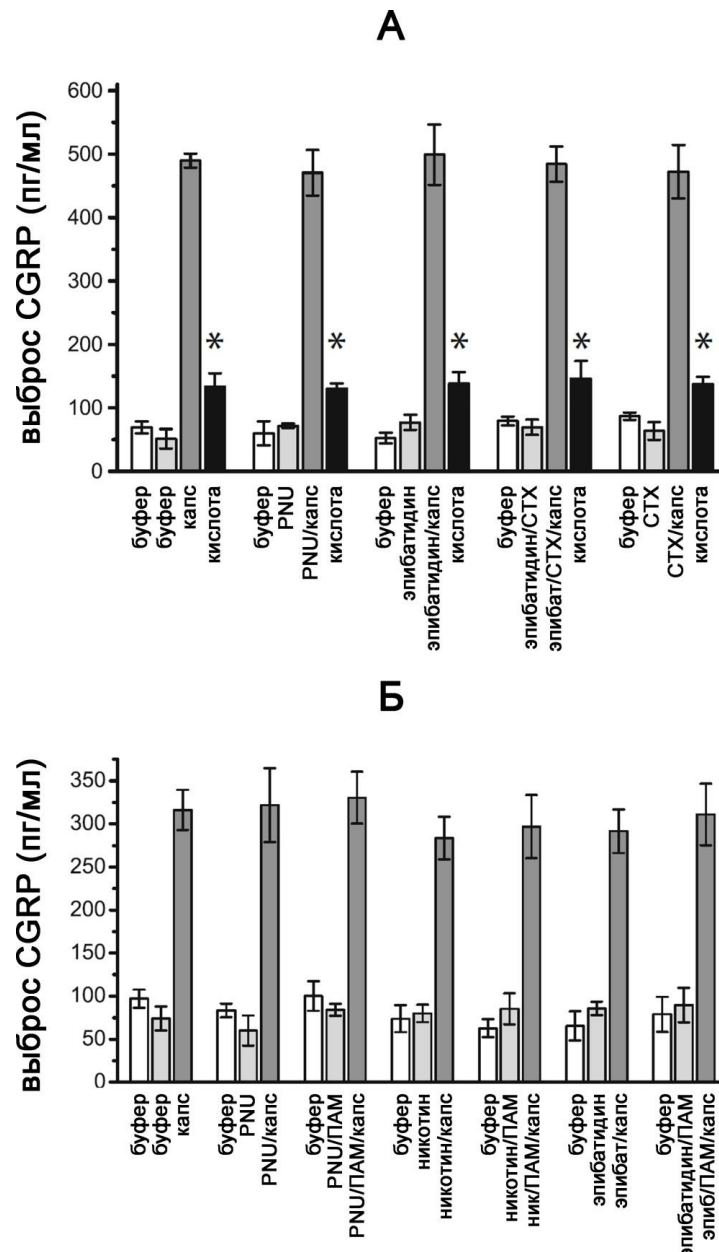


Рис. 5.20 – Высвобождение нейропептида CGRP из (А) первичной культуры нейронов спинномозговых ганглиев крысы и (Б) целых ганглиев. (А) Клетки последовательно инкубировались (1) с буфером (измерялся базовый выброс CGRP), (2) с лигандами нАХР (агонисты эпибатидин (10^{-5} М) и PNU282987 (PNU, 10^{-6} М) и антагонист СТХ (10^{-6} М)), (3) с капсаицином (0,5 мкМ) при наличии или отсутствии лигандов нАХР и (4) с 2Н уксусной кислотой для измерения остаточного внутриклеточного содержания нейропептида CGRP (*- гистограмма отражает 10% от измеренного количества CGRP). Результаты представлены как среднее \pm стандартное отклонение, $n = 5$. **(Б)** Целые ганглии были подвергнуты тем же последовательным инкубациям, но с использованием дополнительных лигандов нАХР (агониста никотина (10^{-4} М) и положительного аллостерического модулятора (ПАМ) PNU120596 (10^{-6} М)], и без последнего этапа добавления уксусной кислоты. Результаты представлены как среднее \pm стандартное отклонение, $n = 4$. Двухвыборочный t-критерий для зависимых выборок выявил статистически достоверные различия выбросом пептида CGRP в контрольных условиях и при стимуляции капсаицином ($p < 0,05$), однако воздействие лигандов нАХР не отражалось на базовом или стимулированном выбросе CGRP (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), $p > 0,05$).

В нейрональной культуре спинномозговых ганглиев базовый уровень выделения пептида CGRP клетками за 10 мин составлял $69 \pm 9,4$ пг/мл (Рис. 5.20А, $n = 5$). Стимуляция капсаицином ($0,5$ мкМ) повышала уровень выброса CGRP в семь раз ($490 \pm 10,9$ пг/мл) (Рис. 5.20А). Относительно суммарного содержания пептида CGRP в клетках эти цифры составляли $3,6$ % при базовом выделении и $25,2$ % при индукции выброса с помощью капсаицина. Добавление неспецифического агониста nAHP эпибатидина (10^{-5} М) и $\alpha 7$ nAHP-селективного агониста PNU282987 (10^{-6} М) или конкурентного антагониста СТХ (10^{-6} М) не изменяли ни базового, ни капсаицин-индуцированного выброса (Рис. 5.20А).

Эксперимент с небольшими модификациями был повторен для целых спинномозговых ганглиев, чтобы исключить возможное влияние методов выделения первичной нейрональной культуры. Сразу после выделения спинномозговых ганглиев они помещались в вентилируемый буфер с периодической сменой раствора для стабилизации базального уровня выделения CGRP. После часовой инкубации средний уровень выброса CGRP составлял 97 ± 11 пг/мл за 15 мин (Рис. 5.20Б, $n = 4$). Применение капсаицина ($0,5$ мкМ) за тот же период времени (15 мин) было способно вызвать усиленное выделение пептида (316 ± 23 пг/мл, Рис. 5.20Б). В то же время агонисты nAHP, такие как никотин (10^{-4} М), эпибатидин (10^{-5} М) и PNU282987 (10^{-6} М) не влияли ни на базальный, ни на индуцированный выброс CGRP из ганглиев. Положительный аллостерический модулятор $\alpha 7$ nAHP (PNU120596, 10^{-6} М) также не изменял наблюдаемых эффектов.

По литературным данным никотин способен провоцировать CGRP выброс из ряда тканей и первоначально этот эффект объяснялся его непосредственным воздействием на нейроны спинномозговых ганглиев [596]. Однако более поздние работы показали, что для подобного действия никотина требуется активация симпатических эфферентных нервных окончаний, которая в свою очередь запускает выброс CGRP первичными афферентными нейронами [597, 598]. Наши результаты также свидетельствуют о непрямом действии агонистов nAHP при стимуляции выделения CGRP этими нейронами.

5.4.8 Клеточные мишени действия эндогенного АХ. Тучные клетки

Непрямое воздействие агонистов АХР на сенсорные ноцицептивные нейроны может осуществляться не только посредством активации других нервных клеток, но и через клетки иммунной системы. Одними из подобных клеток, широко представленными в оболочках головного мозга и задействованными в патогенезе мигрени, являются тучные

клетки. Так как недавние исследования показали, что дегрануляция тучных клеток способна инициировать развитие мигрени [599], мы проверили влияние на этот процесс агонистов АХР: карбамоилхолина и никотина¹³. В связи со статистически более высокой вероятностью проявления мигрени у женщин, в нашем исследовании учитывался пол экспериментальных животных. Кроме того, в некоторых работах показано, что дегрануляция тучных клеток регулируется половыми гормонами и может сильно различаться в зависимости от пола животного [600].

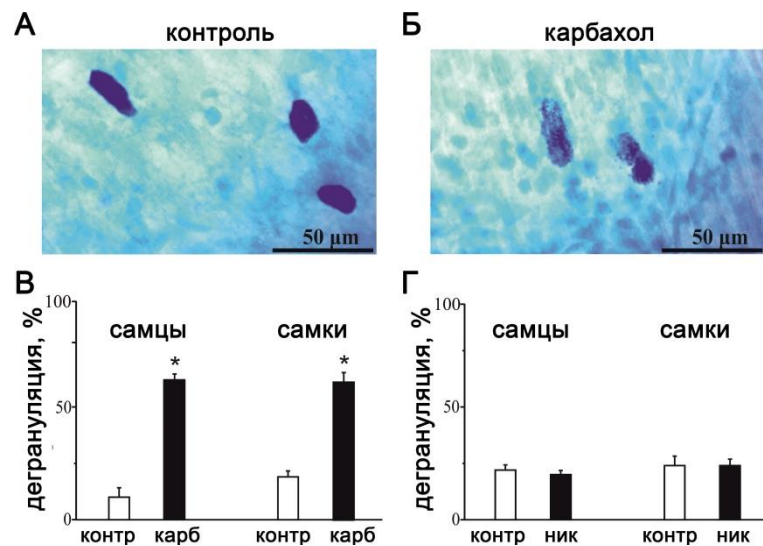


Рис. 5.21 – Эффекты добавления карбахола и никотина на дегрануляцию тучных клеток в твердой мозговой оболочке крыс. (А) Пример интактных тучных клеток в контроле. (Б) Пример дегранулированных в присутствии 50 мкМ карбахола тучных клеток. (В) Гистограммы, отражающие эффект 50 мкМ карбахола на дегрануляцию тучных клеток самцов и самок крыс. (Г) Гистограммы, отражающие отсутствие эффекта добавления 100 мкМ никотина на дегрануляцию тучных клеток самцов и самок крыс. Результаты представлены как среднее \pm стандартное отклонение, $n = 4$, U-критерий Манна-Уитни, $*p < 0,05$.

На рисунке 5.21 представлены микрофотографии тучных клеток в контрольных условиях (Рис. 5.21А) и после 20 мин воздействия 50 мкМ карбамоилхолина (Рис. 5.21Б). Во втором случае видна явная дегрануляция тучных клеток в образце. В контрольных условиях у самцов крыс дегрануляция наблюдалась в $10 \pm 8\%$ ($n = 4$) клеток, тогда как после воздействия 50 мкМ карбамоилхолина этот параметр статистически достоверно увеличился до $62 \pm 5\%$ (Рис. 5.21В, $n = 4$, $p < 0,05$). У самок в контроле

¹³ Совместно с проф. Гиниатуллиным Р.А. и его сотрудником Михайловым Н., Институт молекулярных исследований имени А.И. Виртанена Университета Восточной Финляндии, Финляндия

дегранулированными были $19 \pm 5\%$ тучных клеток, а карбамоилхолин повышал эту цифру до $61 \pm 8\%$ (Рис. 5.21В, $n = 4$, $p < 0,05$).

В отличие от карбамоилхолина, никотин (100 мкМ) не вызывал дегрануляции тучных клеток (Рис. 5.21Г), хотя инкубация с ним препарата оболочек мозга также достоверно увеличивала частоту ноцицептивных сигналов, передаваемых по *nervus spinosus*, ветви чувствительного тройничного нерва (Рис. 5.15Д, Е). Уровень дегрануляции тучных клеток составлял $22 \pm 4\%$ и $20 \pm 4\%$ в контрольных и опытных препаратах у самцов, и $24 \pm 8\%$ и $24 \pm 5\%$ у самок, соответственно (Рис. 5.21Г, $n = 4$, $p > 0,05$). Таким образом, впервые обнаружено, что воздействие карбамоилхолина, но не никотина приводит к дегрануляции тучных клеток в оболочках головного мозга. Следовательно, проноцицептивное действие карбамоилхолина в оболочках головного мозга крыс может объясняться как его прямым воздействием на первичные афферентные нейроны тройничного ганглия, так и опосредованным дегрануляцией тучных клеток, приводящей в выделению набора провоспалительных и проноцицептивных агентов в непосредственной близости от ноцицептивных нервных волокон [601-605]. Стоит отметить, что дегрануляция тучных клеток может приводить к очень длительной активации ноцицепторов оболочек мозга и продолжительной головной боли [599, 606].

5.4.9 Роль холинергической нервной передачи при ноцицепции в оболочках головного мозга

Схематическое изображение на рисунке 5.22 суммирует полученные в этом исследовании результаты, а также включает некоторые литературные данные о роли парасимпатических нервов в мозговых оболочках.

Постганглионарные парасимпатические нервные волокна могут высвобождать АХ, что может приводить к дегрануляции тучных клеток в оболочках мозга, действуя главным образом через mAХР. Из тучных клеток высвобождается ряд провоспалительных медиаторов и цитокинов, поддерживающих нейровоспаление в мозговых оболочках. Также АХ может оказывать проноцицептивное действие, непосредственно активируя как мускариновые, так и никотиновые АХР на нервных окончаниях нейронов сенсорного тройничного ганглия.

Основной медиатор мигренозных болей нейропептид CGRP может высвобождаться из пептидергических нервных волокон и усиливать холинергическую нервную передачу. Это может происходить из-за усиленного выделения АХ, так как CGRP может запускать

внутриклеточную сигнализацию в нервных клетках посредством изменения концентрации ионов Ca^{2+} [607, 608]. Также может происходить непосредственное связывание данного пептида с мембранными АХР. Для CGRP не исключена роль шаперона, обеспечивающего облегчение внутриклеточной сборки АХР и их выхода на поверхность клеток, как это было выявлено в случае АТФ-управляемых P2X3 рецепторов [609]. Последнее предположение подтверждается обнаруженной повышенной экспрессией $\alpha 7$ нАХР и совместным аксональным транспортом с пептидом CGRP в пептидергических афферентных нейронах (Рис. 5.18 В-Д, 19Д, Е). Таким образом, CGRP может действовать по разным механизмам, что заслуживает дальнейшего изучения.

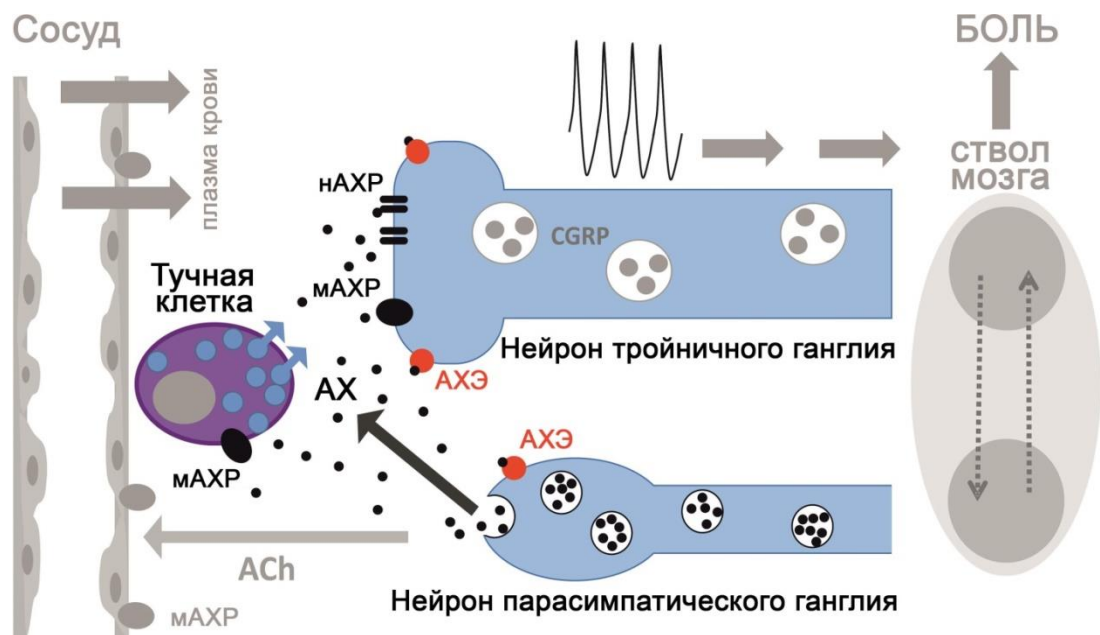


Рис. 5.22 – Схематическое изображение роли холинергической нервной передачи при ноцицепции в оболочках головного мозга. Оболочки головного мозга иннервируются как чувствительной ветвью тройничного нерва, так и постганглионарными парасимпатическими нервными волокнами. АХ, выделяемый парасимпатическими волокнами может активировать тучные клетки через мАХР и ноцицептивные нервные окончания, действуя как на нАХР, так и мАХР. Такая согласованная активация АХР приводит к усилению ноцицептивной нервной передачи в чувствительной ветви тройничного нерва (*nervus spinosus*). Время жизни АХ ограничено благодаря активности ацетилхолинэстеразы (АChE), которая расщепляет избыток этого нейромедиатора. Кроме того, действуя на мускариновые АХР ацетилхолин может приводить к расширению небольших сосудов в оболочках мозга и выходу плазмы крови в окружающие ткани. На уровне ствола головного мозга обе нервной системы могут взаимодействовать через тройнично-парасимпатический рефлекс, приводящий к устойчивой активности нервных клеток. Таким образом, результатом холинергической нервной передачи в оболочках мозга является выброс провоспалительных агентов и цитокинов тучными клетками, выход плазмы крови, возбуждение и сенситизация ноцицептивных афферентных нервных волокон, приводящее к развитию болевых ощущений.

Как и в других тканях организма, холинергическая нервная передача зависит от доступности и активности ряда специфических ферментов, в частности, ацетилхолинэстеразы (AChE) и бутирилхолинэстеразы (BuChE). Наличие обоих ферментов было нами показано в нервных волокнах мозговых оболочек. Помимо всего прочего, АХ может вызывать расширение сосудов в оболочках мозга и выход плазмы крови в окружающие ткани, действуя через mAХР [546]. Все перечисленные механизмы могут усиливать ноцицептивную нервную передачу и, соответственно, головную боль, обеспечивая тройнично-парасимпатический рефлекс [544].

5.5 Функциональная активность nАХР в организме. Воспаление

Воспалительные процессы в той или иной степени вовлечены в патогенез практически любого заболевания и зачастую тесно взаимосвязаны с нейрональной сигнализацией.

В представленной работе основным объектом исследования стали нейтрофилы самцов мышей из очага воспалительной реакции, для которых роль nАХР изучена в недостаточной мере. Нейтрофилы принимают участие в реакциях врожденного и адаптивного иммунитета, они обладают мощным бактерицидным и фунгицидным действием, продуцируют цитокины и другие биологически активные молекулы [610, 611]. Нейтрофилы, развивающиеся в костном мозге с последующим выходом в кровоток, экспрессируют многочисленные протеолитические ферменты и цитотоксические белки, а также мембранные и цитоплазматические субъединицы NADPH-оксидазы, фермента, катализирующего образование супероксид анион радикала, предшественника других активных форм кислорода (АФК)). Среди иммунных клеток организма нейтрофилы являются самыми быстрыми и мощными эффекторами острой фазы воспаления [612, 613]. Чрезвычайно важна регуляция их активности для предотвращения развития неконтролируемой воспалительной реакции.

В последние годы все большей популярностью пользуются исследования функционирования так называемых не-нейрональных nАХР в клетках иммунной системы, эпителия, эндотелия и др. Известно, что в нейтрофилах экспрессируются как mAХР, так и nАХР нескольких подтипов [614, 615], но их точный субъединичный состав и непосредственная функциональная роль остаются недостаточно изученными. Особенное внимание привлекла недавно открытая ключевая роль $\alpha 7$ nАХР макрофагов и подобных им иммунных клеток в «холинергическом противовоспалительном рефлекс», объединяющем иммунные процессы и их контроль со стороны нервной системы (см.

главу 3.6.1 Холинергический противовоспалительный рефлекс). Считается, что центральная нервная система защищает организм от чрезмерного воспаления путем регуляции активности иммунных клеток через $\alpha 7$ нАХР. Так, стимуляция $\alpha 7$ нАХР защищала организм от сепсиса путем ингибирования Толл-подобных рецепторов посредством активации фосфатидилинозитол-3-киназы, что было показано с использованием мышинных моделей полимикробного сепсиса и эндотоксемии, а также макрофагальных клеточных культур при воздействии бактериальных липополисахаридов [616]. Продукция фактора некроза опухолей и хемокина MIP-2, а также альвеолярная миграция были значительно ниже у нейтрофилов мышей после активации $\alpha 7$ нАХР, что было показано в моделях *E. coli*-вызванной пневмонии и липополисахарид-индуцированного острого повреждения легких [617]. Адгезия нейтрофилов и их миграция через гематоэнцефалический барьер были уменьшены у $\alpha 7$ нАХР-дефицитных мышей по сравнению с диким фенотипом. Это приводило к уменьшению повреждения нейронов у $\alpha 7$ нАХР $-/-$ мышей с менингитом [618] и степени развивающегося нейровоспаления [619]. Воздействие никотина, эпibatидина и цитизина на нейтрофилы человека *in vitro* приводило к повышенной продукции ими интерлейкина-8 и сопутствующим реакциям (продукции АФК и активации NF- κ B), наблюдаемая реакция блокировалась мекамиламином, неспецифическим ингибитором нейрональных нАХР [620]. Однако попытка типирования нАХР, ответственных за представленные реакции оказалась невозможна из-за очень высоких требующихся концентраций лигандов, не сравнимых с типичными константами активации или ингибирования нейрональных нАХР. Таким образом, недостаточно изучено, какие подтипы нАХР экспрессируются нейтрофилами и участвуют в их защитных реакциях.

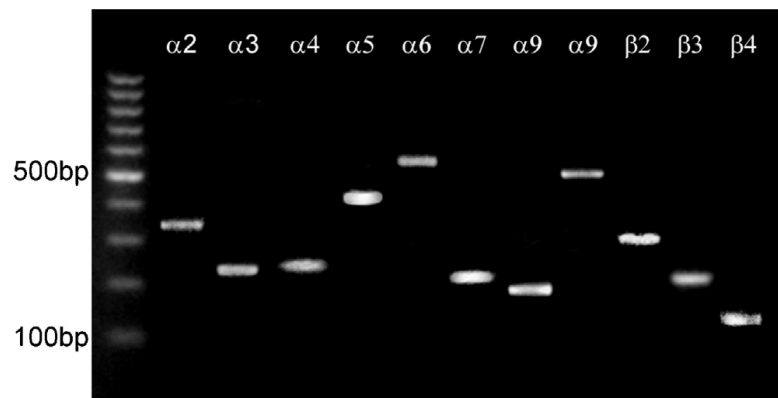


Рис. 5.23 – ПЦР анализ спектра мРНК субъединиц нАХР, представленных в перитонеальных нейтрофилах самцов мышей BALB/c. С использованием суммарной мРНК нейтрофилов в качестве матрицы были амплифицированы специфические ПЦР-продукты для $\alpha 2$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$ и $\beta 2$ - $\beta 4$ субъединиц нАХР (n=5).

В нашей работе с использованием комплекса методов впервые проведено типирование нАХР, модулирующих такие специфические функции нейтрофилов, выделенных из очага воспаления, как продукция активных форм кислорода и адгезия. На первом этапе методом ПЦР в нейтрофилах мышей линии BALB/c было обнаружено большое разнообразие субъединиц нАХР: $\alpha 2$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$ и $\beta 2$ - $\beta 4$ (Рис. 5.23), которые могут комбинироваться, создавая широкий спектр подтипов нАХР на поверхности клеток.

Кальциевый имиджинг является наиболее показательным тестом активности нАХР в не-нейрональных клетках, т.к. активация всех нАХР приводит к кратковременному входу ионов Ca^{2+} внутрь клетки. Разные подтипы нАХР сильно отличаются по степени кальциевой проницаемости, которая в том числе зависит и от скорости их десенситизации. Именно высокая скорость десенситизации $\alpha 7$ нАХР приводит к очень резкому и кратковременному Ca^{2+} -току через его открытый канал по сравнению с гетеромерными нАХР. В нейтрофилах, как и в других невозбудимых клетках, приток Ca^{2+} из внеклеточной среды инициирует высвобождение ионов кальция из внутриклеточных депо [621]. Предполагается, что при активации нАХР в иммунных клетках кальциевый сигнал может запускаться не столько по ионотропному, сколько по метаботропному механизму, хотя на данный момент имеются лишь косвенные доказательства этого [622].

Кальциевый имиджинг¹⁴ выявил сильную гетерогенность популяции нейтрофилов по базовому уровню внутриклеточной концентрации ионов кальция ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ц}}$) и спонтанным ее изменениям (Рис. 5.24А). Добавление никотина (0.01 – 10 мкМ) провоцировало резкое повышение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ц}}$ в нейтрофилах, для которых не было замечено спонтанных осцилляций внутриклеточного уровня ионов кальция (Рис. 5.24А). Такие клетки составляли около трети всей клеточной популяции. С возрастанием концентрации никотина повышалась резкость и синхронность наблюдаемых ответов, которые полностью подавлялись за счет преинкубации с неспецифическим антагонистом нАХР карамифеном (1 мкМ). Гетерогенность реакций нейтрофилов из очага воспаления неудивительна, т.к. они могут пребывать в самых различных функциональных состояниях, для которых показана корреляция с динамикой $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ц}}$. Активация сигнальных внутриклеточных каскадов за счет повышения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ц}}$ важна для выполнения ряда базовых функций нейтрофилов, среди которых генерация активных форм кислорода

¹⁴ Совместно с научными сотрудниками Института биофизики клетки РАН: к.б.н. Сафроновой В.Г. (заведующий лабораторией клеточной нейробиологии), к.б.н. Вульфус Е.А., к.ф.-м.н. Гриневичем А.А., к.б.н. Мальцевой В.Н., к.б.н. Бережновым А.В., Федотовой Е.И.

NADPH оксидазой для защиты от патогенных бактерий и грибов и клеточная адгезия [623-625].

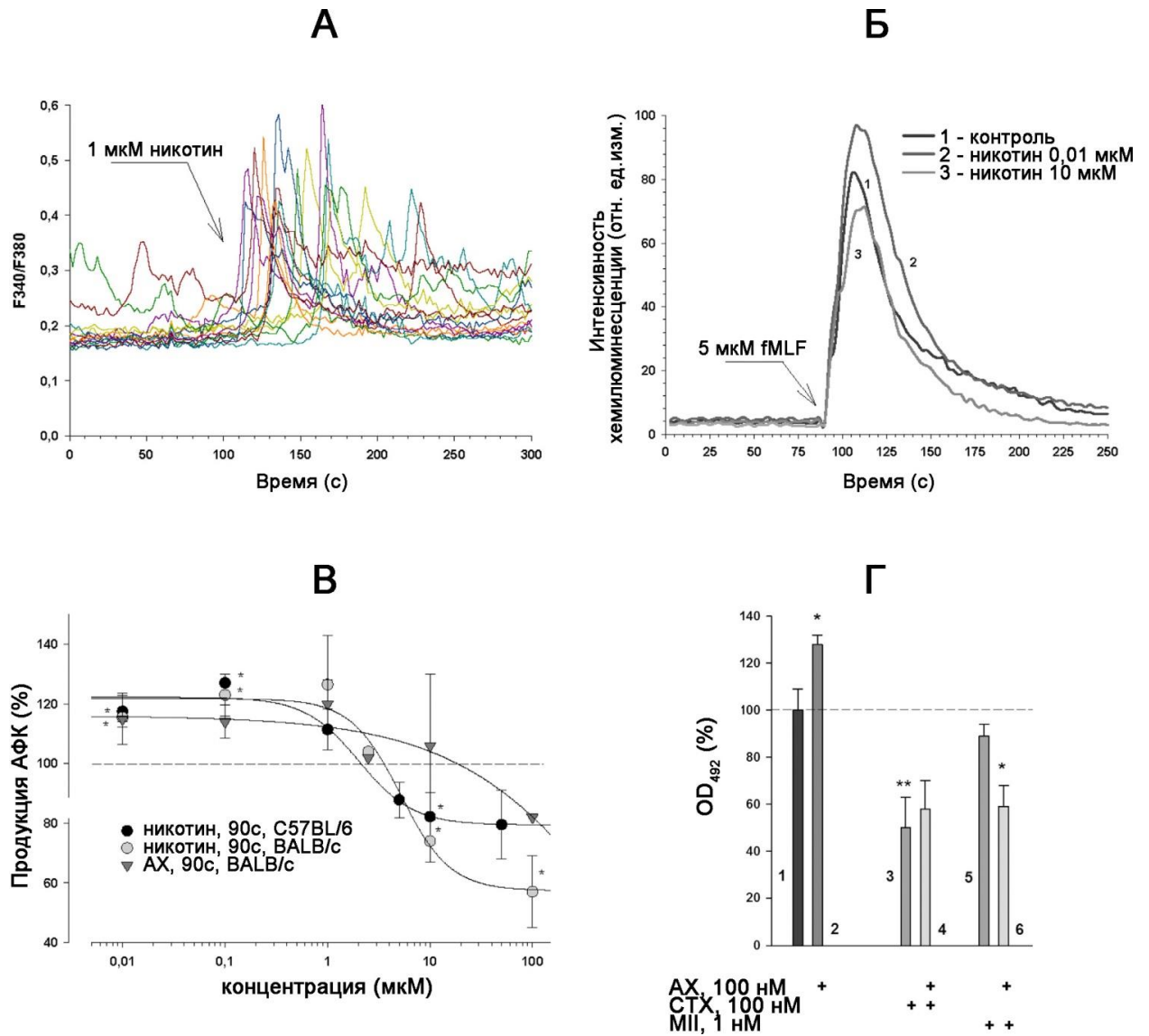


Рис. 5.24 – Влияние nAChR на функционирование нейтрофилов самцов мышей, выделенных из очага воспалительной реакции. (А) Кальциевый имиджинг реакции нейтрофилов самцов мышей BALB/c на добавление никотина (1 мкМ). **(Б, В)** Хемилюминесцентный анализ влияния холинергических агонистов (АХ и никотина) на продукцию АФК, вызванную добавлением хемотактического трипептида fMLF (5мкМ). **(Б)** Примеры ответов нейтрофилов на воздействие fMLF в контроле и при добавлении никотина, **(В)** кривые дозозависимости эффектов агонистов nAChR на продуцирование АФК нейтрофилами. **(Г)** Нормализованные показатели адгезии нейтрофилов на пластике после инкубации (60 мин) в контрольном буферном растворе и при воздействии холинергических лигандов. Результаты приведены как среднее \pm стандартная ошибка среднего, $*p < 0.05$, двухвыборочный t-критерий Стьюдента для независимых выборок, $n = 3 - 5$.

Хемотактический трипептид бактериального происхождения fMLF (N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine) инициирует каскад сигнальных реакций в нейтрофилах, включающий повышение $[Ca^{2+}]_i$, активацию G_i -связанных рецепторов и протеинкиназ C (PKC), который приводит к увеличению выработки АФК за счет усиленной работы NADPH-оксидазы (Fig. 24Б). Холинергические лиганды напрямую не провоцировали продукцию активных форм кислорода (АФК) нейтрофилами, но кратковременное воздействие ацетилхолина и никотина (30-180 сек) существенно изменяло выброс АФК, индуцированный добавлением fMLF (Рис. 5.24Б, В)¹⁵. Антагонисты nAHPr CTX (10 нМ – 5 мкМ), α -конотоксины МП (0,2 мкМ) и [A10L]PnIA (1 мкМ) подавляли потенцирующее действие агонистов. α -Конотоксин МП является специфическим антагонистом ($IC_{50} \leq 1$ нМ) $\alpha 3\beta 2$ и $\alpha 3\alpha 6\beta 2$ nAHPr, гораздо менее аффинен к $\alpha 7$ подтипу ($IC_{50} \geq 200$ нМ) и не реагирует с другими nAHPr до 10 мкМ [442, 626]. [A10L]PnIA (1 мкМ) также ингибирует $\alpha 3\beta 2$, но несколько более аффинен к $\alpha 7$ nAHPr [626-628]. Интересна дозозависимость наблюдаемых эффектов агонистов: АХ и никотин в концентрациях 0,01-1 мкМ потенцировали продукцию АФК, но ингибировали при более высоких концентрациях (Рис. 5.24В). Вероятно, кратковременность и двухфазная дозозависимость действия агонистов объясняется быстрой десенситизацией nAHPr. Стоит отметить, что концентрационная и временная зависимость эффектов холинергических агонистов в кальциевом имиджинге и в тесте на продукцию активных форм кислорода совпадали, что может указывать на активацию NADPH оксидазы в нейтрофилах при повышении $[Ca^{2+}]_i$ при воздействии агонистов nAHPr.

Изменения в концентрации ионов кальция в цитозоле могут также существенно менять экспрессию поверхностных адгезивных белков нейтрофилов (селектинов и интегринов), позволяющих им взаимодействовать с окружающими клетками и двигаться в направлении очага поражения. Действительно, адгезия нейтрофилов повышалась после часовой инкубации с 10 – 100 нМ АХ, но не никотина (Рис. 5.24Г)¹⁵. Интересным фактом было подавление как этого эффекта, так и адгезии напрямую посредством 100 нМ CTX (Рис. 5.24Г). α -Конотоксин МП (1 нМ) также был способен предотвращать действие АХ (Рис. 5.24Г). Прямое действие CTX на адгезивные свойства нейтрофилов может указывать на функциональную значимость заблокированного или десенситизированного состояния $\alpha 7$ nAHPr, которые могут быть не менее важны для запуска внутриклеточных каскадов в

¹⁵ Совместно с научными сотрудниками Института биофизики клетки РАН: к.б.н. Сафроновой В.Г. (заведующий лабораторией клеточной нейробиологии), к.б.н. Вульфус Е.А., к.ф.-м.н. Гриневичем А.А., к.б.н. Мальцевой В.Н., к.б.н. Бережновым А.В., Федотовой Е.И.

не-нейрональных клетках, чем активированное состояние рецептора. Также не стоит забывать о способности гранулоцитов к выделению эндогенного АХ, подавление действия которого и может выражаться в отмеченном эффекте СТХ.

В совокупности полученные данные свидетельствуют, что при развитии воспалительной реакции активация $\alpha 7$ и $\alpha 3\beta 2$ (возможно, также $\alpha 6$ -содержащих) нАХР влияет на основные функции нейтрофилов: регулирует двухфазным образом выработку ими активных форм кислорода и усиливает их клеточную адгезию. Активация нАХР индуцирует кратковременный вход ионов кальция внутрь клетки нейтрофила по ионотропному механизму либо активирует метаботропный сигнальный каскад. Оба эти механизма приводят к быстрому выбросу Ca^{2+} из внутриклеточных депо. В результате повышенная внутриклеточная концентрация ионов Ca^{2+} влияет на целый ряд внутриклеточных процессов в нейтрофилах, включая активацию NADPH-оксидазы и процессы клеточной адгезии [621].

5.6 Нейропластичность. Норма и патология

нАХР широко представлены в организме как на нервных клетках, где они принимают участие в различных аспектах нервной передачи, так и вне нервной системы, участвуя в регуляции разнообразных клеточных процессов. Безусловно, с нарушениями в их функционировании связан целый ряд патологических процессов. В связи с наиболее высоким уровнем экспрессии нАХР в ЦНС, в настоящем исследовании была поставлена задача изучить их роль в таком базовом процессе в мозге, как нейропластичность при физиологических и патофизиологических условиях: нейрогенезе у взрослых грызунов и при ранних стадиях болезни Паркинсона, смоделированных у мышей, соответственно.

5.6.1 Нейрогенез

В зубчатой фасции гиппокампа (ЗФ) нейрогенез или новообразование нервных клеток продолжается на протяжении всей жизни организма [629, 630]. Этот отдел мозга ответственен за пространственную и эпизодическую память [631]. В постнатальном периоде развития организма новообразованные нейроны мигрируют из субгранулярной зоны ЗФ во внутреннюю треть ее гранулярного слоя, где происходит их дифференцировка и встраивание в нейрональную сеть [632-634]. Довольно хорошо изучены факторы, влияющие на сам процесс постнатального нейрогенеза [635], но гораздо меньше известно о развитии и интеграции вновь образованных нервных клеток. Многие исследования

показывают, что $\alpha 7$ nAHR играет немаловажную роль в ряде процессов нейропластичности [636, 637] и роста нейритов при развитии нервных клеток. Также этот рецептор критичен для обучения, развития и поддержания памяти и внимания (Dani and Bertrand, 2007). В представленной работе было решено изучить, может ли $\alpha 7$ nAHR принимать участие в развитии нервных клеток при нейрогенезе у взрослых крыс и мышей. Для этого было проведено комплексное исследование, включающее Вестерн блот анализ, гистохимию с использованием антител и флуоресцентных α -нейротоксинов, а также электрофизиологию отдельных нервных клеток на вибротомных срезах мозга.

Прицельно изучались нервные клетки зубчатой фации гиппокампа (ЗФ): здесь новообразованные нейроны формируются и мигрируют из субгранулярной зоны во внутреннюю треть ее гранулярного слоя, где происходит их дифференцировка и встраивание в нейрональную сеть [638, 639]. Гистохимическое окрашивание $\alpha 7$ nAHR было обнаружено в субгранулярной зоне (наиболее интенсивная реакция) и внутренней трети гранулярного слоя ЗФ (Рис. 5.25A1) с использованием антител $\alpha 7(8-25)$ ¹⁶. При количественных измерениях, проведенных в гранулярном слое ЗФ, была установлена статистически достоверная обратная корреляция между интенсивностью иммунореакции и расстоянием от субгранулярной зоны (Рис. 5.25 A2, A3, статистический тест корреляции Пирсона, $p < 0,005$). На контрольных срезах иммунная реакция не развивалась при отсутствии первичных антител $\alpha 7(8-25)$.

Специфичность антител $\alpha 7(8-25)$ была продемонстрирована ранее в отношении пептида $\alpha 7(8-25)$ и рекомбинантного внеклеточного домена $\alpha 7$ субъединицы, а также продемонстрирована их отрицательная реакция в отношении nAHR мышечного типа [498]. В настоящем исследовании характеристика их специфичности была продолжена. Так, методом Вестерн блот анализа показана их способность выявлять полноразмерную субъединицу $\alpha 7$ nAHR (55 кДа) после аффинной очистки рецептора с использованием конъюгата α -кобратоксина с сефарозой (Рис. 5.26). Преинкубация антител с пептидом $\alpha 7(8-25)$, а также их замена иммуноглобулинами нормальной сыворотки кролика приводила к отсутствию иммунной реакции в Вестерн-блот анализе.

¹⁶ Совместно с к.б.н. Джон Д. и к.б.н. Хендерсон З., Университет г. Лидса, Великобритания

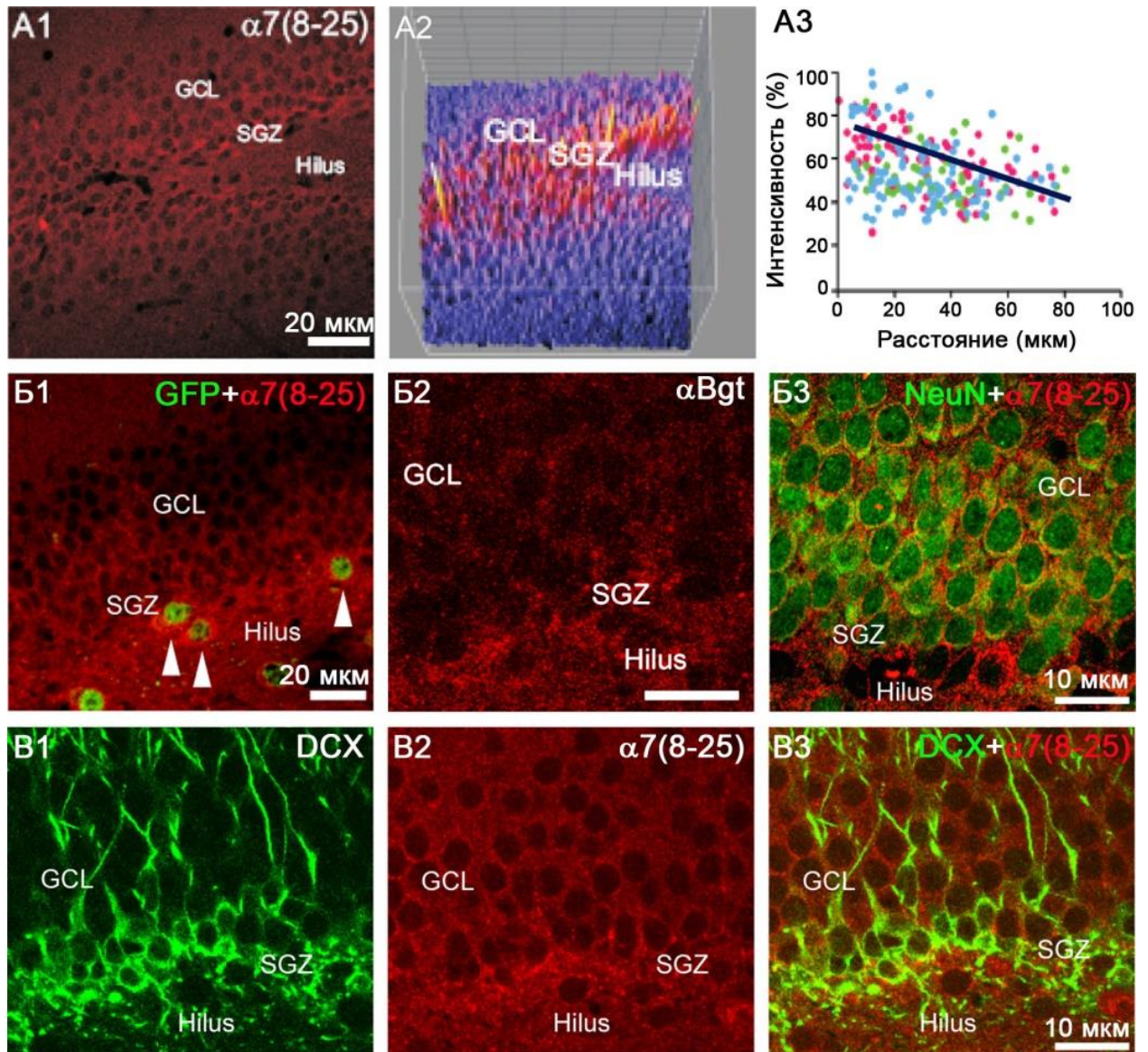


Рис. 5.25 – Иммуногистохимическое окрашивание $\alpha 7$ nAChR сконцентрировано во внутренней трети гранулярного слоя ЗФ, где совпадает с маркерами незрелых нейронов, а также на телах ГАМК-эргических интернейронов. (A1) Визуализация $\alpha 7$ nAChR на срезах мозга крыс в области ЗФ с использованием антител $\alpha 7(8-25)$. (A2) График распределения интенсивности окрашивания, показанного в (A1). (A3) Корреляция между интенсивностью флуоресцентного иммуногистохимического окрашивания $\alpha 7$ nAChR и расстоянием между окрашенными гранулярными клетками и субгранулярной зоной ЗФ. (B1) Иммуногистохимическая визуализация $\alpha 7$ nAChR с использованием антител $\alpha 7(8-25)$ (красный цвет) на телах ГАМК-эргических интернейронов ЗФ мышей линии GAD67-GFP (белые стрелки), которые экспрессируют зеленый флуоресцентный белок GFP (зеленый цвет). (B2) Связывание биотинилированного αBgt в субгранулярной области ЗФ крыс. Двойное иммуногистохимическое окрашивание клеточных слоев ЗФ крысы антителами к $\alpha 7(8-25)$ (красный цвет) и к белкам-маркерам (B3) зрелых (NeuN (зеленый цвет)) и (B1-B3) незрелых (даблкортин, DCX, зеленый цвет)) гранулярных клеток, соответственно. GCL – гранулярный клеточный слой; SGZ – субгранулярная зона; hilus – хилус ЗФ.

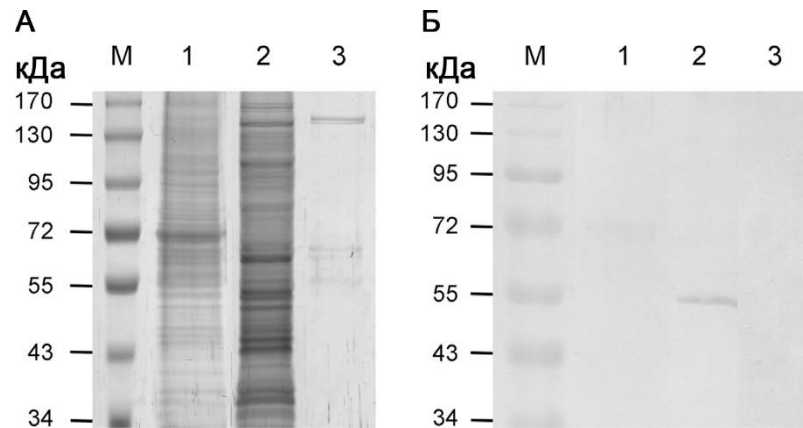


Рис. 5.26 – Характеристика специфичности поликлональных антител $\alpha 7(8-25)$ в отношении $\alpha 7$ nAHP, аффинно-очищенного с использованием конъюгата α -кобратоксина с сефарозой. (А) Электрофорез в ПААГ фракций клеток GH_4C_1 , экспрессирующих $\alpha 7$ nAHP человека (окраска серебром), и (Б) Вестерн блот анализ способности антител $\alpha 7(8-25)$ детектировать $\alpha 7$ nAHP в полученных фракциях клеток. (А1, Б1) лизат клеток, (А2, Б2) СТХ-аффинно-очищенные белки и (А3, Б3) белки, неспецифически связавшиеся с сефарозой. М – маркеры молекулярной массы белков.

Также в качестве положительного контроля иммуносpezifичности антител $\alpha 7(8-25)$ были гистохимически окрашены срезы мозга мышей линии GAD67-GFP, у которых ГАМК-эргические интернейроны зубчатой фассии могут быть идентифицированы по присутствию зеленого флуоресцентного белка (GFP). Известно, что данные нейроны обогащены $\alpha 7$ nAHP [228, 640] и, как и ожидалось, антитела $\alpha 7(8-25)$ окрашивали тела ГАМК-эргических интернейронов ЗФ, что видно по ко-локализации иммуноокрашивания с флуоресценцией GFP (Рис. 5.25Б1). Результаты по распределению окраски антителами $\alpha 7(8-25)$ в гранулярном слое ЗФ мышей подтверждали корреляцию, обнаруженную ранее на срезах мозга крыс.

Дополнительным контролем специфичности детекции $\alpha 7$ nAHP в субгранулярной зоне ЗФ послужило связывание с этой областью среза биотинилированного α Bgt (Рис. 5.25Б2), которое предотвращалось преинкубацией с избытком никотина или α -кобратоксина. Надежность примененного протокола визуализации $\alpha 7$ nAHP была доказана ранее (Рис. 5.2) с использованием тканей мышей, нокаутных по гену $\alpha 7$ субъединицы nAHP.

Следующим этапом работы стало сравнение экспрессии $\alpha 7$ nAHP и белков-маркеров различных стадий развития гранулярных клеток ЗФ. Ядра клеток внешних двух третей гранулярного слоя ЗФ интенсивно связывали антитела к белку NeuN (Рис. 5.25Б3, *красный цвет*), известному ядерному маркеру зрелых нейронов [641]. Тела же и дендриты клеток внутренней трети гранулярного слоя и субгранулярной зоны ЗФ крыс и мышей

интенсивно окрашивались антителами к даблкортину (DCX, Рис. 5.25В1, В3, *зеленый цвет*), белку-маркеру незрелых нейронов, ассоциированному с микротрубочками [642]. Как видно из Рис. 5.25В2, В3, окрашивание $\alpha 7$ nAХР (*красный цвет*) было локализовано в области ЗФ, совпадающей с окраской антителами к даблкортину (*зеленый цвет*), но не белку NeuN (Рис. 5.25В3), подтверждая экспрессию исследуемых рецепторов новообразованными незрелыми нейронами.

Далее мы провели электрофизиологические измерения функциональной активности $\alpha 7$ nAХР в ряде клеток ЗФ: ГАМК-эргических интернейронах, зрелых и незрелых гранулярных клетках¹⁷. Идентификация клеток базировалась на ряде критериев как при проведении эксперимента, так и при последующем его анализе. Принималось во внимание расположение нейронов в ЗФ [643], а также интенсивная флуоресценция GFP в ГАМК-эргических интернейронах мышей линии GAD67GFP [496]. Так, интернейроны – довольно крупные клетки, встречающиеся в хилусе, субгранулярной зоне и молекулярном слое ЗФ. Гранулярные же клетки заметно мельче, круглой формы и сосредоточены в гранулярном слое ЗФ, при этом новообразованные незрелые клетки располагаются исключительно во внутренней трети гранулярного слоя [644]. При электрофизиологическом анализе клетки наполнялись биоцитином и их принадлежность к той или иной группе нервных клеток дополнительно подтверждалась согласно известным чертам их морфологии [633, 645, 646]. Так, известно, что для интернейронов характерно наличие как апикального, так и базального дендритов, отличающихся строением в виде «бусин» (Рис. 5.27А, верхняя микрофотография). Гранулярные клетки обладают только апикальным дендритом; у незрелых клеток он почти не имеет отростков и довольно гладкий (Рис. 5.27А, средняя микрофотография), в то время как дендриты зрелых клеток, наоборот, весьма ветвисты и покрыты своеобразными «бугорками» (Рис. 5.27А, нижняя микрофотография).

Как у крыс, так и у мышей добавление ацетилхолина (3 мМ) в присутствии 5 мкМ атропина вызывало nAХР-подобные ответы в 43% интернейронов (Рис. 5.27Б1, *n=22, ток черного цвета*) и в 17% незрелых гранулярных клеток (Рис. 5.27Б2, *n=60, ток черного цвета*), но подобные ответы отсутствовали среди зрелых гранулярных нервных клеток (Рис. 5.27Б3, *n=36, ток черного цвета*). Стоит отметить, что ответы интернейронов были значительно больше по амплитуде, чем у незрелых гранулярных клеток (Рис. 5.27В). Также наблюдалась тенденция к уменьшения числа отвечающих гранулярных клеток с увеличением возраста животного (Рис. 5.27Г).

¹⁷ Совместно с к.б.н. Джон Д. и к.б.н. Хендерсон З., Университет г. Лидса, Великобритания

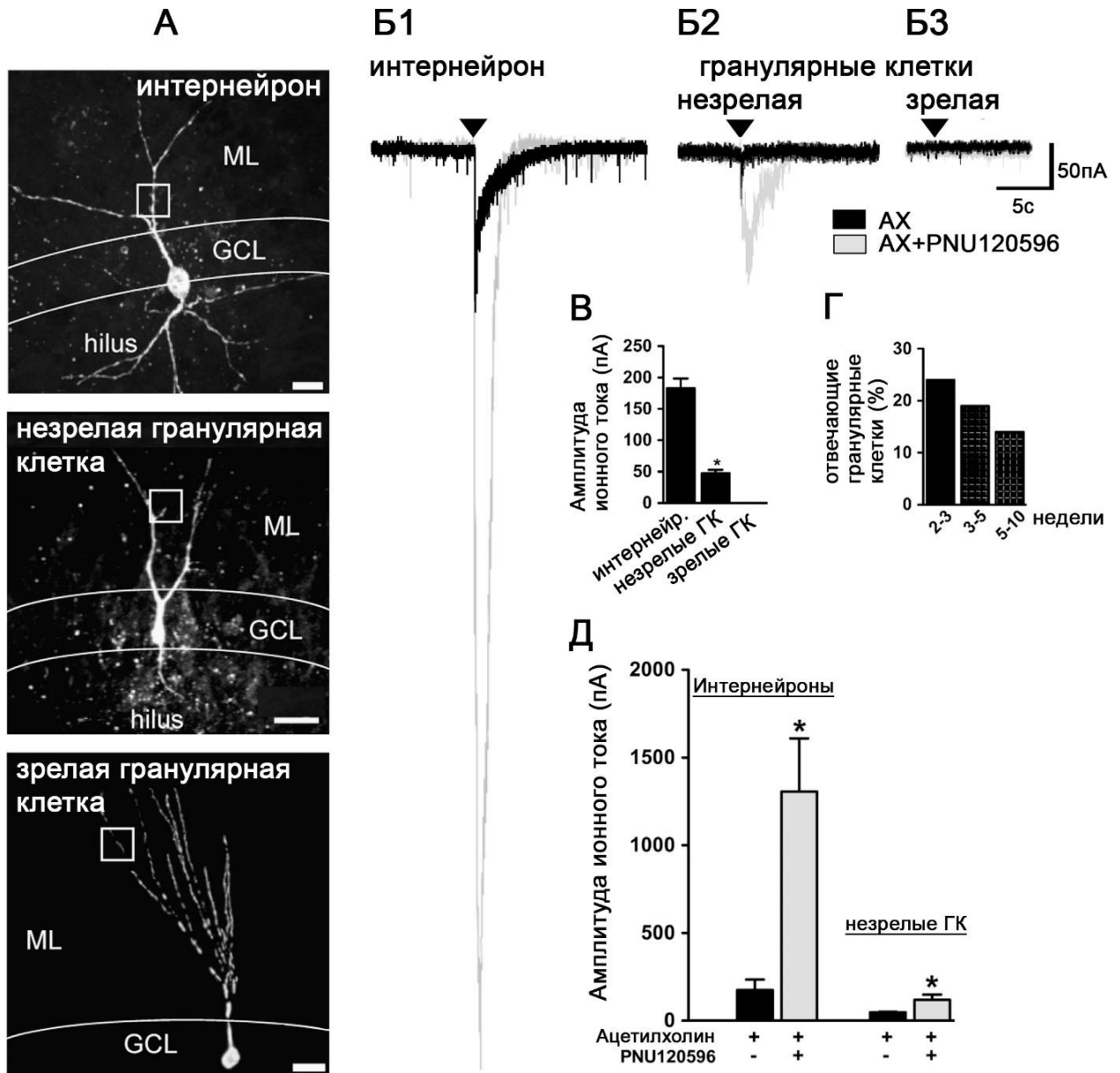


Рис. 5.27 – Нервные клетки ЗФ реагируют на добавление ацетилхолина ионными токами, которые могут быть усилены добавлением PNU120596, специфического положительного модулятора $\alpha 7$ nAХР. (А) Примеры заполненных биоцитином нервных клеток: интернейрона, незрелой и зрелой гранулярных клеток ЗФ крысы. Масштаб: 20 мкм. (Б) Примеры индуцированных ацетилхолином (3 мМ) токов до (черный цвет) и после (серый цвет) PNU120596 (10 мкМ) в (Б1) интернейроне, (Б2) незрелой и (Б3) зрелой гранулярных клетках. Измерения проводились методом пэтч-клампа целых клеток при потенциале -60 мВ в присутствии 5 мкМ атропина. (В) Средние значения амплитуд ацетилхолин-индуцированных токов в перечисленных клетках у мышей линии GAD67-GFP, $*p < 0.001$. (Г) Процент отвечающих на добавление ацетилхолина незрелых гранулярных клеток в зависимости от постнатального возраста мышей линии GAD67-GFP. (Е) Средние значения амплитуд индуцированных ацетилхолином (3 мМ) токов до (черный цвет) и после (серый цвет) добавления PNU120596 (10 мкМ) в интернейронах и незрелых гранулярных клетках ($*p < 0.05$, U-критерий Манна-Уитни). ML – молекулярный слой, GCL – гранулярный слой, hilus – хилус.

PNU120596, специфический положительный модулятор $\alpha 7$ nAХР [286], также применяющийся *in vivo* для улучшения когнитивных функций [286, 438, 480], активно усиливал наблюдающиеся ответы нейронов на добавление ацетилхолина (Рис. 5.27Б1, Б2, Д, *токи серого цвета*). Эти ответы успешно блокировались антагонистом $\alpha 7$ nAХР метиликаконитином (4 нМ), но не блокатором $\beta 2$ -содержащих гетеромерных nAХР дигидро-бета-эритроидином (данные не приведены). Такие блокаторы ионотропных глутаматных рецепторов как 10 мкМ NBQX и 25 мкМ D-AP5, а также антагонист ионотропных ГАМК рецепторов 10 мкМ бикикуллин также не оказывали заметного влияния на ацетилхолин-индуцированные токи (данные не приведены).

Таким образом, иммуногистохимически мы показали наличие $\alpha 7$ nAХР в слоях ЗФ крыс и мышей (субгранулярной зоне и внутренней трети гранулярного слоя), где происходит нейрогенез в постнатальном периоде развития. Полученные данные были подтверждены специфическим связыванием флуоресцентного α Bgt. Паттерн экспрессии $\alpha 7$ nAХР коррелировал с наличием белков-маркеров незрелых нервных клеток. В электрофизиологических экспериментах впервые было показано, что часть незрелых гранулярных клеток ЗФ реагировала на добавление ацетилхолина, продуцируя ионные токи, которые могли быть усилены или подавлены специфическими лигандами $\alpha 7$ nAХР: положительным аллостерическим модулятором PNU120596 и антагонистом метиликаконитином, соответственно. Подобные ответы не наблюдались в зрелых гранулярных клетках. В совокупности, приведенные данные впервые демонстрируют, что функциональные $\alpha 7$ nAХР экспрессируются новообразованными нейронами зубчатой фасции гиппокампа и располагаются на их телах и дендритах. При этом на финальных этапах дифференцировки новых нейронов экспрессия $\alpha 7$ nAХР угнетается.

Насчет основной функции новообразованных гранулярных клеток среди ученых нет единого мнения, но хорошо изучено, что именно новообразованные нейроны предпочтительно вовлекаются в нейрональные сети при формировании пространственной памяти [647, 648]. Вероятно, эти нейроны способны заменять старые дегенерирующие клетки ЗФ [649], а также улучшать обучаемость животных [650].

$\alpha 7$ nAХР могут влиять на клеточные процессы в новообразованных нервных клетках посредством ряда механизмов. Так, активация этих рецепторов не только приводит к прямому входу ионов кальция внутрь клеток, но также активирует потенциал-чувствительные кальциевые ионные каналы и вызывает высвобождение кальция из внутриклеточных депо через рианодиновые рецепторы или инозитол (1,4,5)-трифосфатные рецепторы [216]. Эти процессы влияют на цитоплазматический уровень

ионов кальция и, соответственно, на транскрипцию генов через ряд сигнальных путей (CaMKII/IV, ERK/MAPK и CREB [197, 651, 652], которые являются основными для долговременных процессов нейропластичности в ЦНС [653], а также важны для памяти и обучаемости [654, 655].

Одна из предполагаемых функций $\alpha 7$ nAХР в незрелых нервных клетках – интенсификация синаптической передачи, так называемое долговременное потенцирование определенных синаптических контактов [633]. Такое потенцирование было замечено при стимуляции $\alpha 7$ nAХР в поле СА1 гиппокампа [656-658], вентральной тегментальной зоне [659] и в ЗФ [660, 661].

Необходимость $\alpha 7$ nAХР для правильного развития новообразованных нейронов в ЗФ подтверждается исследованием [662], проведенным с использованием тканей мышей, нокаутных по гену $\alpha 7$ субъединицы nAХР. В этой работе было показано, что новообразованные нейроны нокаутных животных (по сравнению с контрольными мышами) отличались более короткими и менее ветвистыми дендритами, а также более «незрелой» кинетикой ГАМК-эргических постсинаптических ионных токов, в том числе более долгим периодом деполяризации.

Из всех приведенных данных можно заключить, что холинергическая сигнализация в ЗФ гиппокампа, приводящая к активации обнаруженных $\alpha 7$ nAХР в новообразованных нервных клетках, необходима для их дифференцировки и интеграции в сформированную нейрональную сеть у взрослых грызунов.

5.6.2 Ранние стадии болезни Паркинсона

Изучение роли nAХР в механизмах нейропластичности мозга при патологических изменениях было исследовано при моделировании досимптомной и ранней симптоматической стадий болезни Паркинсона у мышей.

Патогенез болезни Паркинсона характеризуется прогрессирующей дегенерацией дофаминергических нейронов в базальных ядрах (стриатуме и субстанции Нигра), что приводит к прогрессирующему двигательному расстройству у пациентов [663]. Дегенерация нигростриатных дофаминергических нейронов сопровождается изменениями экспрессии и функциональной активности различных подтипов nAХР [664, 665]. Среди нейрональных подтипов nAХР гомопентамерные $\alpha 7$, а также гетеромерные $\alpha 4\beta 2^*$ и $\alpha 6\beta 2^*$ рецепторы лучше всего представлены в мозге млекопитающих [48], где они в основном располагаются пресинаптически и, в частности, принимают участие в регуляции выброса

нейротрансмиттеров, в том числе и дофамина [585]. Активация nAHP на нейронах nigrostriатной системы может не только регулировать, но и напрямую стимулировать высвобождение дофамина [666].

В настоящем исследовании использовались мышинные модели¹⁸ двух этапов болезни Паркинсона [667]:

1. Модель досимптомной стадии была получена двукратными инъекциями МРТР (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин) при индивидуальной дозе 12 мг/кг. В этой модели не наблюдалось изменений в двигательном поведении у мышей, однако около 30% клеточных тел и 60% аксональных окончаний дофаминергических нейронов погибали

2. Модель ранней симптоматической стадии была получена четырьмя инъекциями МРТР в той же дозе. При этой модели у животных ухудшалась двигательная активность, при этом наблюдалась гибель 43% клеточных тел и 68% окончаний аксонов дофаминергических нейронов .

Данные модели хорошо отражают особенности развития болезни Паркинсона [668], а именно появление первых клинических симптомов при гибели 50-60% nigrostriатных нейронов [669]. Считается, что отсутствие клинических признаков связано с развитием компенсаторных механизмов в головном мозге [670], которые и могут послужить основной целью для новой более эффективной нейропротекторной терапии. В этом контексте наши задачи состояли в определении количественных изменений nAHP в nigrostriатной системе мышей при досимптомной и ранней симптоматической стадиях болезни Паркинсона. Сравнение полученных значений с контрольными и между собой позволяло оценить, какие подтипы nAHP могут быть вовлечены в компенсаторные процессы в выживающих nigrostriатных нейронах, а также понять, происходят ли какие-то кардинальные изменения в составе nAHP, отражающие переход к двигательной дисфункции у мышей на ранней симптоматической стадии.

Количественное определение экспрессии индивидуальных подтипов nAHP в стриатуме и субстанции Нигра мышей¹⁹ проводили с помощью радиолигандного анализа с использованием ³H-эпibatидина, α -конотоксина ¹²⁵I-MPIY⁰ и ¹²⁵I- α Bgt (Таблица 5.2)²⁰. ³H-эпibatидин использовали для определения содержания гетеромерных nAHP, содержащих

¹⁸ Моделирование этапов болезни Паркинсона у мышей проводилось совместно с акад. РАН Угрюмовым М.В., Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

¹⁹ Препараты стриатума и субстанции Нигра предоставлены акад. РАН Угрюмовым М.В., Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

²⁰ Совместно с к.х.н. Крюковой Е.В., Лаборатория лиганд-рецепторных взаимодействий ИБХ РАН

субъединицы $\alpha 4^*$, $\alpha 6^*$ и $\beta 2^*$ (* указывает на возможное присутствие других субъединиц в рецепторном комплексе). Количество обнаруженных эписбатидин-связывающих сайтов в гомогенатах отделов мозга мышей находилось в диапазоне от 20 до 64 фмоль/мг общего белка. В стриатуме общее количество эписбатидин-связывающих участков на досимптомной стадии болезни Паркинсона значительно снижалось (до $66,51 \pm 5,7\%$ от контрольного уровня), а затем оставалось постоянным на ранней симптоматической стадии (Рис. 5.28А, Таблица 5.2). Это объясняется гибелью нейронов и соответствующим уменьшением количества аксональных окончаний, содержащих нАХР (см. описание 1-ой мышинной модели). В препаратах субстанции Нигра на досимптомной стадии наблюдалось увеличение на 60% общего числа эписбатидин-связывающих сайтов (Рис. 5.28А, Таблица 5.2). Данные, полученные для ранней симптоматической стадии, нельзя было считать надежными из-за слишком малого объема материи для анализа.

Таблица 5.2 – Изменения в содержании сайтов связывания ^3H -эписбатидина, ^{125}I - αBgt и α -конотоксина ^{125}I -МПУ⁰ в гомогенатах стриатума и субстанции Нигра мышей при моделировании ранних стадий болезни Паркинсона.

	Контроль	Досимптомная стадия	Контроль	Ранняя симпом. стадия
Стриатум				
Содержание белка, мг/мл	0,71±0,07 ^a n=19		1,24±0,1 n=16	
Связывание радиоактивных лигандов	^3H -эписбат. фмоль/мг белка	64,35±10,6 42,8±3,68 66,51±5,7%*	37,91±3,4	26,86±4,92 70,85±12,9%
	^{125}I -МПУ ⁰ фмоль/мг белка	44,95±6,63 36,7±3,29 81,64±7,31%	33,69±5,72	16,31±3,76 48,41±11,16%*
	^{125}I - αBgt фмоль/мг белка	8,89±0,59 10,62±1,4 119,5±15,75%	8,44±1,09	6,33±0,62 75,0±7,34%
Субстанция Нигра				
Содержание белка, мг/мл	0,43±0,04 n=10		0,33±0,02 n=10	
Связывание радиоактивных лигандов	^3H -эписбат. фмоль/мг белка	20,4±2,55 32,6±5,85 159,8±20,0%*		
	^{125}I - αBgt фмоль/мг белка	14,63±1,33 9,13±1,07 62,41±7,31%*	14,14±0,85	10,50±1,06 74,25±7,5%*

* $p < 0,05$, t-критерий Стьюдента для независимых выборок. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего.

α -Конотоксин МП из яда морской улитки *Conus magus* связывается с наномолярным средством с $\alpha\beta 2^*$ и $\alpha 3\beta 2^*$ нАХР [443]. По сравнению со многими другими α -конотоксинами он гораздо медленнее диссоциирует из комплекса с рецептором [626] и его йодированное производное ^{125}I -МПУ⁰ может с успехом применяться для обнаружения указанных подтипов нАХР. Как показали автордиографические исследования с использованием срезов мозга мышей, нокаутных по гену $\alpha 6$ субъединицы нАХР, именно

$\alpha 6^*$ рецепторы являются основными для связывания $^{125}\text{I-MPP}^0$ в ЦНС грызунов [443]. Таким образом, в настоящей работе экспрессия $\alpha 6^*$ нАХР оценивалась по связыванию $^{125}\text{I-MPP}^0$. Количество сайтов связывания $^{125}\text{I-MPP}^0$ в гомогенате стриатума варьировало от 16 до 45 фмоль/мг общего белка, на досимптомной стадии их число уменьшилось до $81,64 \pm 7,31\%$ от контрольного уровня и продемонстрировало дальнейшую тенденцию к снижению (до $48,41 \pm 11,16\%$) параллельно с развитием более тяжелого поражения ЦНС на ранней симптоматической стадии (Рис. 5.28В, Таблица 5.2). К сожалению, аналогичные измерения не могли быть выполнены с достаточной воспроизводимостью для препаратов субстанции Нигра из-за их малых количеств.

Содержание гомопентамерных $\alpha 7$ нАХР определялось по связыванию их специфического антагониста $^{125}\text{I-}\alpha\text{Bgt}$. Для препаратов стриатума на досимптомной стадии было обнаружено небольшое увеличение (до $119,5 \pm 15,75\%$) в количестве сайтов связывания $^{125}\text{I-}\alpha\text{Bgt}$ (Рис. 5.28Б, Таблица 5.2). Напротив, небольшое снижение (до $75,0 \pm 7,34\%$) было обнаружено на ранней симптоматической стадии (Рис. 5.28Б, Таблица 5.2). Однако обе тенденции были статистически не достоверными. В препаратах субстанции Нигра уровень $\alpha 7$ нАХР значительно снижался (до уровня $62,41 \pm 7,31\%$) на досимптомной стадии без дальнейшего снижения на ранней симптоматической стадии (Рис. 5.28Б, Таблица 5.2).

В использованных доклинических моделях болезни Паркинсона дегенерация дофаминергических нервных клеток заканчивается через 6 часов после последней инъекции нейротоксина МРТР мышам. Это сопровождается началом развития компенсаторных процессов, направленных на усиление дофаминергической нервной передачи в нигростриатной системе [671]. Содержание нАХР в стриатуме и субстанции Нигра оценивалось через две недели после последней инъекции МРТР, когда преобладают компенсаторные изменения в функциональной активности выживших дофаминергических нейронов.

$\alpha 6^*$ нАХР в стриатуме расположены исключительно на аксональных окончаниях дофаминергических нейронов [19, 672]. В моделях болезни Паркинсона с МРТР-индуцированным повреждением нейронов гибель тел клеток в субстанции Нигра протекает медленнее и менее выражена, чем дегенерация аксональных окончаний в стриатуме [667]. По нашим данным, при моделировании ранних клинических стадий болезни Паркинсона общее содержание $\alpha 6^*$ нАХР уменьшалось в соответствии с числом погибших окончаний дофаминергических нейронов (Рис. 5.28В, Таблица 5.2). Полученные результаты свидетельствуют о неизменном уровне экспрессии $\alpha 6^*$ нАХР в

дофаминергических нейронах nigrostriатной системы вне зависимости от стадии нейродегенеративного процесса.

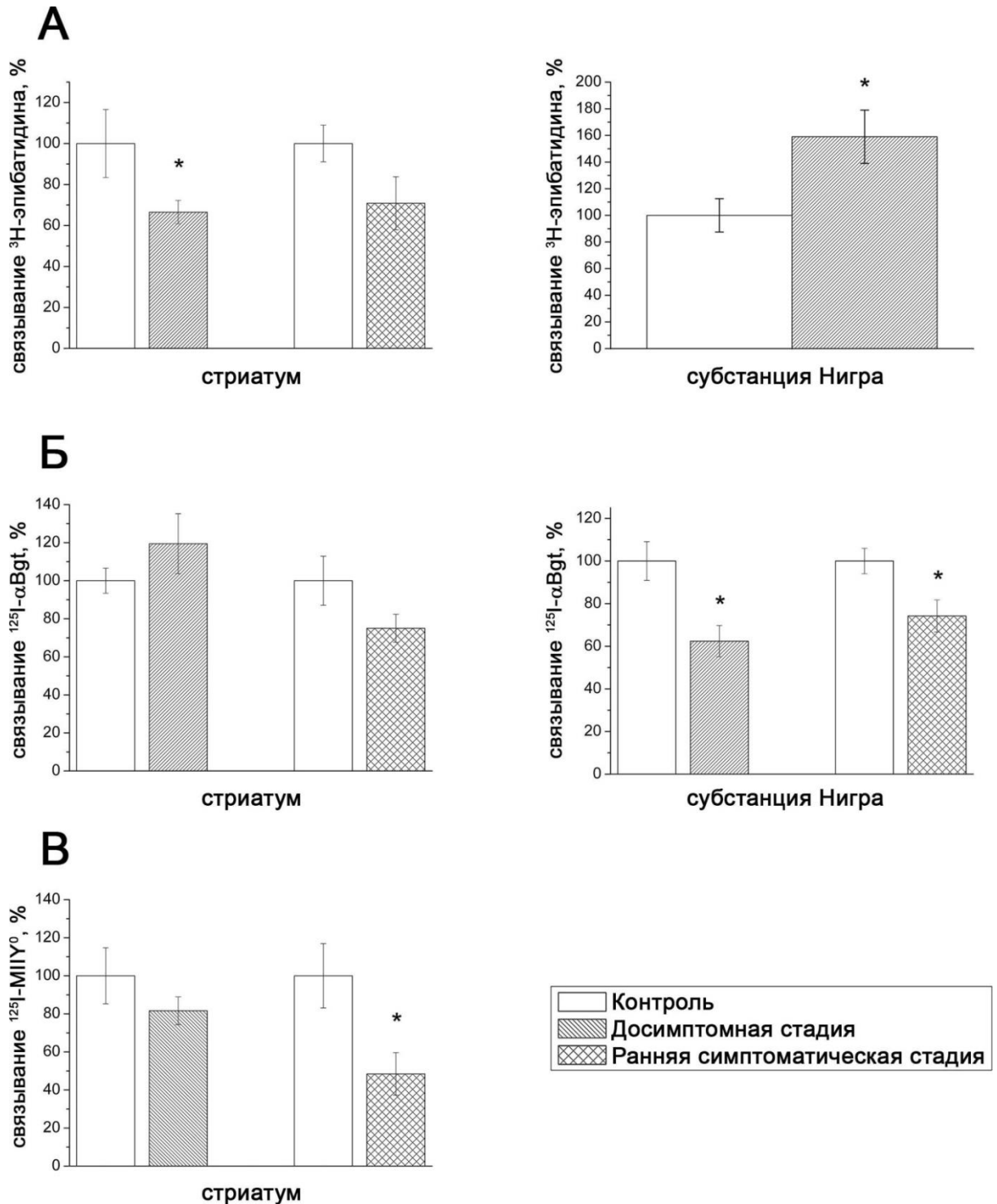


Рис. 5.28 – Нормализованное содержание сайтов связывания (А) ^3H -эпibatидина, (Б) ^{125}I - αBgt и (В) α -конотоксина ^{125}I -МПУ 0 в гомогенатах стриатума и субстанции Нигра мышей в контроле, а также при моделировании досимптомной и ранней симптоматической стадий болезни Паркинсона. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего. * $p < 0,05$, t-критерий Стьюдента для независимых выборок.

В отличие от $\alpha 6^*$ нАХР, $\alpha 4^*$ рецепторы расположены в стриатуме не только на нервных окончаниях дофаминергических нейронов, но и на других нервных клетках [19, 672]. Присутствие $\alpha 4^*$ нАХР на телах дофаминергических нейронов было также продемонстрировано в субстанции Нигра у грызунов [673]. Эпibatидин – неспецифический агонист гетеромерных $\alpha 2 - \alpha 6^*$ нАХР. Наши результаты показывают, что в стриатуме общее количество сайтов связывания ^3H -эпibatидина уменьшалось до 70% от значения в контроле (Табл. 5.2) на досимптомном этапе и практически не изменялось при переходе к ранней симптоматической стадии (Рис. 5.28А). В предыдущих исследованиях было высказано предположение о наличии двух возможных $\alpha 6^*$ - содержащих нАХР в стриатуме мышей: подтипах $\alpha 6\alpha 4\beta 2\beta 3$ и $\alpha 6\beta 2\beta 3$. При умеренном введении МРТР дофаминергические нервные окончания, экспрессирующие $\alpha 6\alpha 4\beta 2\beta 3$ нАХР, могут быть более восприимчивыми к токсическому повреждению, в то время как выжившие нейроны предпочтительно экспрессируют $\alpha 6\beta 2\beta 3$ нАХР. По нашим наблюдениям, в стриатуме при переходе от досимптомной к ранней симптоматической стадии число сайтов связывания эпibatидина остается постоянным, а число $\alpha 6^*$ нАХР уменьшается. Постоянный уровень связывания эпibatидина может поддерживаться за счет относительного увеличения числа $\alpha 4^*$ нАХР, что предполагает участие этого подтипа рецептора в механизмах пластичности мозга.

В отличие от стриатума в субстанции Нигра наблюдалось значительное увеличение количества сайтов связывания ^3H -эпibatидина (до 160% по сравнению с контрольными животными) на досимптомной стадии. Таким образом, этот результат в сочетании с относительным увеличением числа $\alpha 4^*$ нАХР в стриатуме могут указывать на их участие в компенсаторных процессах при токсическом поражении головного мозга.

Также было определено количество сайтов связывания для ^{125}I - αBgt , селективного маркера $\alpha 7$ -содержащих нАХР. В нигростриатной системе $\alpha 7$ нАХР расположены на 50% дофаминергических нейронов, а также на других типах нейронов и глиальных клеток [673, 674]. Имеются указания, что $\alpha 7$ нАХР может быть вовлечен в патогенез болезни Паркинсона. Так, селективный агонист $\alpha 7$ нАХР проявил нейропротекторный эффект при моделировании этого нейродегенеративного заболевания с помощью микроинъекции 6-гидроксидофамина в область нигростриатной системы крыс [675], а при моделировании симптоматической стадии болезни Паркинсона в стриатуме и субстанции Нигра было обнаружено двукратное увеличение $\alpha 7$ -мРНК [676]. Также недавно было показано, что высокоселективный агонист $\alpha 7$ нАХР (АВТ-107) улучшает дофаминергическую нервную

передачу в nigrostriatной системе крыс с повреждениями, вызванными микроинъекцией 6-гидроксидофамина [677].

В субстанции Нигра наблюдалось снижение содержания $\alpha 7$ nAХР уже на досимптомной стадии без дальнейшего снижения при более сильном МРТР-индуцированном поражении ЦНС (Рис. 5.28Б, Таблица 5.2). Поскольку известно, что половина дофаминергических нейронов экспрессирует $\alpha 7$ nAХР, это может свидетельствовать о гибели всех чувствительных к МРТР $\alpha 7$ -содержащих нейронов уже на досимптомной стадии. В стриатуме было обнаружено небольшое увеличение количества сайтов связывания ^{125}I - αBgt на досимптомной стадии и незначительное их уменьшение при переходе к двигательным нарушениям у животных (Рис. 5.28Б, Таблица 5.2). Так как $\alpha 7$ nAХР практически отсутствуют на нервных окончаниях дофаминергических нейронов, наблюдаемое явление может быть связано с участием в механизмах нейропластичности других типов клеток. Недавно предложенная гипотеза предполагает, что нейропротекторное действие, опосредованное $\alpha 7$ nAХР, может происходить благодаря активации системы фосфотидилинозитол-3-киназы (PI3K) [678]. Другим возможным механизмом участия $\alpha 7$ nAХР в пластичности мозга является его главенствующая роль в холинергическом противовоспалительном пути. Нейровоспаление является неотъемлемой частью патогенеза болезни Паркинсона [679], а активация $\alpha 7$ nAХР оказывает противовоспалительный эффект, ингибируя продукцию воспалительных цитокинов иммунными клетками [205, 680, 681]. С учетом этих фактов увеличение уровня $\alpha 7$ nAХР в стриатуме (Рис. 5.28Б, Таблица 5.2) может отражать компенсаторные противовоспалительные процессы в ответ на атаку МРТР.

Таким образом, впервые показано, что основные компенсаторные изменения в уровне экспрессии nAХР в nigrostriatной системе мышей происходят уже на досимптомной стадии при моделировании болезни Паркинсона. По нашим данным nAХР, содержащие $\alpha 4$ и $\alpha 7$, но не $\alpha 6$ субъединицы, могут опосредовать компенсаторные механизмы нейропластичности на досимптомной стадии болезни Паркинсона, но более детальное выяснение их конкретной роли требует проведения дальнейших исследований.

5.7 Низкомолекулярные соединения

Благодаря участию nAХР в столь важных физиологических процессах в организме как ноцицепция, воспаление, нейрогенез и др., а также их заметной роли в патогенезе заболеваний в том числе нейродегенеративных, их рассматривают как перспективную фармакологическую мишень. В связи с этим актуальным является направленный поиск и

дизайн новых специфичных низкомолекулярных лигандов нАХР, структурно-функциональный анализ которых приведет к более полному пониманию механизма лиганд-рецепторного связывания и позволит создать соединения с заданными терапевтическими свойствами. В последнее время стартовал ряд клинических испытаний агонистов и позитивных аллостерических модуляторов нАХР, в частности, $\alpha 7$ нАХР, для потенцирования когнитивных функций человека при различных нарушениях [390, 682, 683]. «Молчашие» же агонисты, которые не способны самостоятельно вызывать активацию рецептора, но, связываясь с ним, приводят к его десенситизации, считаются перспективными как противовоспалительные и антиболевые агенты при хронических болях [684]. Их агонистическая активность проявляется только в присутствии позитивных аллостерических модуляторов, таких как PNU120596, способных очень сильно снизить скорость десенситизации $\alpha 7$ нАХР. Считается, что «молчашие» агонисты действуют на иммунные клетки скорее посредством метаболитной активности $\alpha 7$ нАХР, а не через классический ионотропный механизм, приводя к результирующему противовоспалительному эффекту. Ингибиторы же мышечного нАХР демонстрируют выраженную миорелаксантную активность, предотвращая связывание АХ с рецептором на постсинаптической мембране нервно-мышечного соединения и блокируя тем самым распространение потенциала действия [685].

5.7.1 6-бромогипафорин

В настоящем исследовании было протестировано действие на нАХР 6-бромогипафорина (6-БГФ), выделенного из тканей голожаберного моллюска *Hermisenda crassicornis* из бухты Троицы в Японском море (Рис. 5.29)²¹. Этот моллюск используется в качестве удобной модельной системы для изучения клеточных и молекулярных процессов, лежащих в основе обучения и памяти [686]. Ранее 6-БГФ был обнаружен в губке *Pachymatisma johnstoni* [687], однако для него не было задокументировано какой-либо биологической активности, несмотря на спектр известных функций его близкого аналога 5,6-дибромгипафорина [688] и других производных бромированного индола [689].

Методом конкурентного радиолигандного анализа было показано вытеснение 6-бромогипафорином йодированного- α Bgt из ортостерического участка связывания $\alpha 7$ нАХР человека ($IC_{50} = 23$ мкМ), но отсутствие его связывания с рецептором мышечного

²¹ 6-бромогипафорин предоставлен акад. РАН Стоником В.А., ТИБОХ ДВО РАН, г. Владивосток

типа *Torpedo californica* (Рис. 5.30А)²². Для выяснения характера активности 6-БГФ был проведен кальциевый имиджинг, по результатам которого было показано его агонистическое действие на $\alpha 7$ нАХР человека ($EC_{50} = 82,7 \pm 20,1$ мкМ (среднее значение \pm стандартная ошибка среднего, $n = 5$)) в присутствии позитивного аллостерического модулятора PNU120596 (10 мкМ) (Рис. 5.30Б, В). 6-БГФ был определен как специфический «молчащий» агонист $\alpha 7$ нАХР, т.к. при электрофизиологических измерениях²³ он не оказывал заметного влияния на химерный $\alpha 7$ нАХР/ГлиР (внеклеточный домен $\alpha 7$ нАХР, а трансмембранный и цитоплазматический домены глицинового $\alpha 1$ рецептора) или $\alpha 4\beta 2$ нАХР.

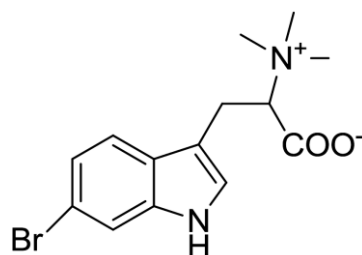


Рис. 5.29 – Химическая структура 6-бромогипафорина (6-БГФ) моллюска *Hemissenda crassicornis*.

Интересно сравнить наши результаты для 6-БГФ с литературными данными об активности его ближайшего гомолога 5,6-дибромогипафорина, а также некоторых других соединений, содержащих бромированные индольные кольца. Как упоминалось в обзоре [689], соединения, выделенные из морских источников, такие как 5,6-дибромтриптамин, 5,6-дибром-N-метилтриптамин, 5,6-дибром-N-метилтриптофан, 5,6-дибром-N,N-диметилтриптамин и 5,6-дибромгипафорин обладают противоопухолевыми и противовоспалительными свойствами. Для нас наиболее интересными являются их биологические активности, подразумевающие, если не взаимодействие с нАХР, т.к. мы не смогли найти такие данные, то по крайней мере связывание с клеточными рецепторами или ионными каналами. Косвенные данные указывают на подобные взаимодействия. Гипафорин, индольный алкалоид, выделяемый грибом *Pisolithus microcarpus*, повышает концентрацию ионов кальция в цитозоле и ингибирует рост кончика корня из-за временной деполяризации плазматической мембраны и реорганизации цитоскелета [690]. Кроме того, введение гипафорина вызывало значительное удлинение фазы медленного сна у мышей, что также предполагает взаимодействие его с

²² Совместно с д.х.н. Кашеверовым И.Е., руководителем Лаборатории лиганд-рецепторных взаимодействий ИБХ РАН

²³ Совместно с к.б.н. Кудрявцевым Д.С., Лаборатория лиганд-рецепторных взаимодействий ИБХ РАН

нейрональным рецептором или ионным каналом [691]. В этом отношении нельзя не упомянуть другое соединение, провоцирующее сон и содержащее бромированные остатки триптофана – 33-членный пептид ядовитого морского моллюска *Conus radiatus*, охотящегося на рыб [692]. Однако прямых доказательств молекулярных взаимодействий гипафорина с определенной клеточной мишенью в литературных данных не описано. Таким образом, взаимодействие 6-БГФ с идентифицированной мишенью, а именно с человеческим $\alpha 7$ nAХР, впервые описано для гипафорина и его бромированных аналогов. 6-БГФ определен как специфический среднеаффинный «молчащий» агонист $\alpha 7$ nAХР.

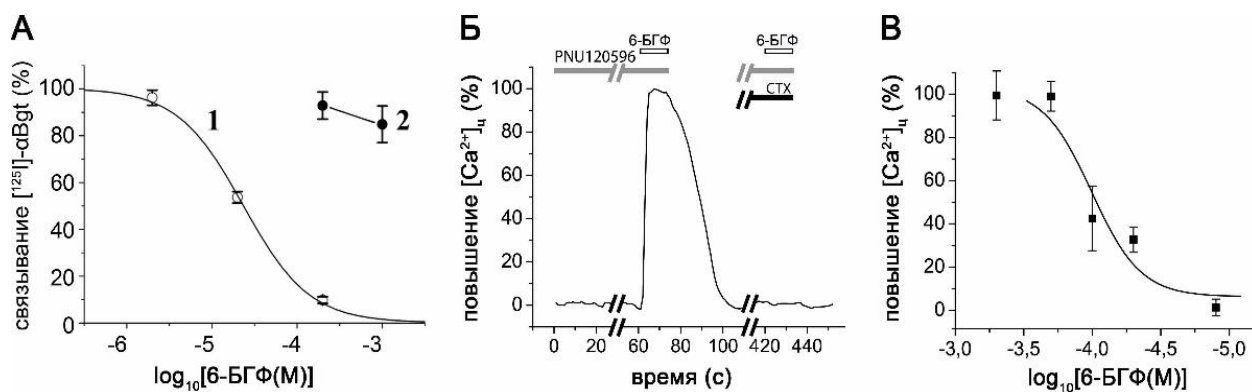


Рис. 5.30 – Действие 6-бромогипафорина (6-БГФ) моллюска *Hermisenda crassicornis* на nAХР. (А) Ингибирование связывания $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{Bgt}$ с $\alpha 7$ nAХР человека, экспрессированного в клетках GH₄C₁ (1, светлые круги), и nAХР мышечного типа *T. californica* (2, темные круги) с помощью 6-БГФ. **(Б)** Повышение внутриклеточной концентрации ионов кальция ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ц}}$) в клетках нейробластомы Neuro2a, экспрессирующих $\alpha 7$ человека, при добавлении 200 мкМ 6-БГФ и его ингибирование при преинкубации клеток с 2 мкМ СТХ. **(В)** Кривая дозозависимости повышения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ц}}$ от концентрации 6-БГФ. $\text{EC}_{50} = 82,7 \pm 20,1$ мкМ. В кальциевом имиджинге все растворы лигандов содержали 10 мкМ PNU120596. Результаты 2 – 5 независимых экспериментов приведены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

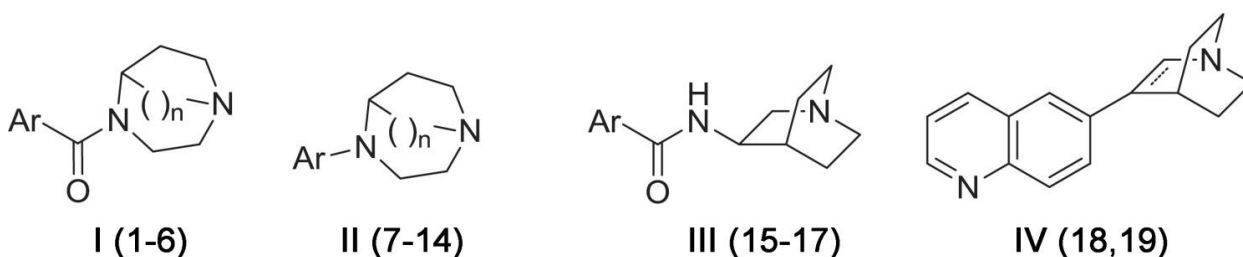
5.7.2 Производные хинолина

В настоящей работе были протестированы свойства ряда новых химически синтезированных производных хинолина с целью получения специфических лигандов $\alpha 7$ nAХР и выявления структурных особенностей, обеспечивающих их селективность (Рис. 5.31).

Стандартный фармакофор лигандов $\alpha 7$ nAХР состоит из положительно заряженного атома азота, акцепторной группы водородной связи, расположенной на определенном расстоянии, и ароматической группы, обеспечивающей гидрофобные $\pi\text{-}\pi$ взаимодействия [693, 694]. В структурах известных агонистов $\alpha 7$ nAХР, таких как PNU-282987, EVP-6124,

акцепторная группа водородной связи представляет собой амид или карбамат в случае SSR-180711. Но были получены и другие высокоаффинные агенты, такие как ТС-1698 [403] или СР-810123 [695], в структуре которых азациклическая группа, содержащая положительно заряженный атом азота, связана напрямую с ароматической группой, являющейся акцептором водородной связи.

Несколько лет назад Guandalini et al. [696] описали синтез и биологические свойства нескольких никотиновых лигандов, в состав которых входило кольцо хинолина, которые были несколько более аффинными в отношении $\alpha 7$ по сравнению с $\alpha 4\beta 2$ nAХР. Стремясь повысить селективность подобных соединений были синтезированы новые аналоги хинолина, в состав которых включили азациклические фрагменты, типичные для лигандов $\alpha 7$ nAХР. Таким образом, кольцо хинолина или изохинолина было присоединено к азациклической группе напрямую или через амидную связь (структуры I – IV, Рис. 5.31)²⁴.



Ar: 5-, 6-, 7-хинолин; 5-, 6-изохинолин. n = 1, 2

Рис. 5.31 – Схемы химических структур производных хинолина с присоединенными азациклическими группами.

В первичных тестах радиолигандного анализа были отобраны соединения, которые в концентрации 1 мкМ были способны конкурировать с [³H]-цитизином или [³H]-метиликаконитином ([³H]-MLA) за связывание с мембранными препаратами мозга крыс (Таблица 5.3)²⁵. Цитизин позволял протестировать взаимодействие с $\alpha 4\beta 2$ nAХР, метиликаконитин был использован как специфический антагонист $\alpha 7$ nAХР. Если вытеснение радиоактивных агентов составляло менее 20%, соответствующие соединения исключались из дальнейшего анализа. Результатом стал отбор соединений №7, предпочтительно взаимодействовавшего с $\alpha 4\beta 2$ nAХР, а также №11, 13, 14 и 16, которые, напротив, оказались высокоаффинными лигандами $\alpha 7$ nAХР (Табл. 5.3).

²⁴ Аналоги хинолина предоставлены проф. Романелли М.Н., Флорентийский университет, Италия

²⁵ Совместно с проф. Романелли М.Н., Флорентийский университет, Италия

Анализ соединений со структурами А и В позволил впервые выяснить критичные черты $\alpha 7$ nAХР-селективного фармакофора у производных хинолина. Так, при включении в химическую формулу дополнительной карбонильной группы, изучаемые вещества утрачивали аффинность к nAХР (№1-6, Рис. 5.31). При этом предпочтительная аффинность к $\alpha 7$ nAХР зависела от наличия 9-членного гетероцикла в составе соединения (№11-14, Рис. 5.31, Табл. 5.3). Из всех соединений групп С и D только №16 было способно вытеснять [3 H]-метиликаконитин из комплекса с $\alpha 7$ nAХР, все остальные замены были фатальны для активности молекул.

Таблица 5.3 – Аффинность и функциональная активность производных хинолина по отношению к nAХР.

Соединение	Структура*	Радикал (Ar)*	Радиолигандный анализ		Кальциевый имиджинг
			$\alpha 4\beta 2$ nAХР [3 H]-цитизин, K_i (нМ)	$\alpha 7$ nAХР [3 H]-MLA, K_i (нМ)	$\alpha 7$ nAХР EC ₅₀ (мкМ)
Никотин			2,3 ± 0,2	-	-
MLA			-	1,4 ± 0,2	-
7	II	6-хинолин	412 ± 37	> 1000	антагонист
11	II	6-хинолин	> 1000	96 ± 8	1,41 ± 0,56
13	II	7-хинолин	> 1000	117 ± 12	1,09 ± 0,38
14	II	6-изохинолин	> 1000	248 ± 22	
16	III	7-хинолин	> 1000	287 ± 24	1,57 ± 0,23

* см. Рис. 5.31.

Данные приведены как среднее ± стандартная ошибка среднего (n = 4 (радиолигандный анализ) и n = 3 (кальциевый имиджинг)).

Для более детальной проверки свойств отобранных соединений был проведен кальциевый имиджинг их взаимодействия с $\alpha 7$ nAХР человека, экспрессированного в Neuro2a клетках. Соединение 7 в концентрациях до 300 мкМ подавляло АХ-индуцированный вход ионов кальция внутрь клеток (Рис. 5.32А, Табл. 5.3). Напротив, соединения 11, 13 и 16 являлись агонистами $\alpha 7$ nAХР (EC₅₀ = 1,1 – 1,6 мкМ, Рис. 5.32Б, Табл. 5.3) в присутствии 10 мкМ PNU120596. Данная реакция была рецептор-опосредованной, т.к. полностью подавлялась 4 мкМ СТХ. Стоит отметить, что в электрофизиологических экспериментах все протестированные вещества (7, 11, 13 и 16) в концентрации 50 мкМ ингибировали ионные токи, опосредованные активацией $\alpha 7$

нАХР/ГлиР и $\alpha 4\beta 2$ нАХР²⁶. Таким образом, соединения 11, 13 и 16 могут рассматриваться как «молчащие» агонисты, т.к. проявляют свои свойства только в присутствии позитивного аллостерического модулятора.

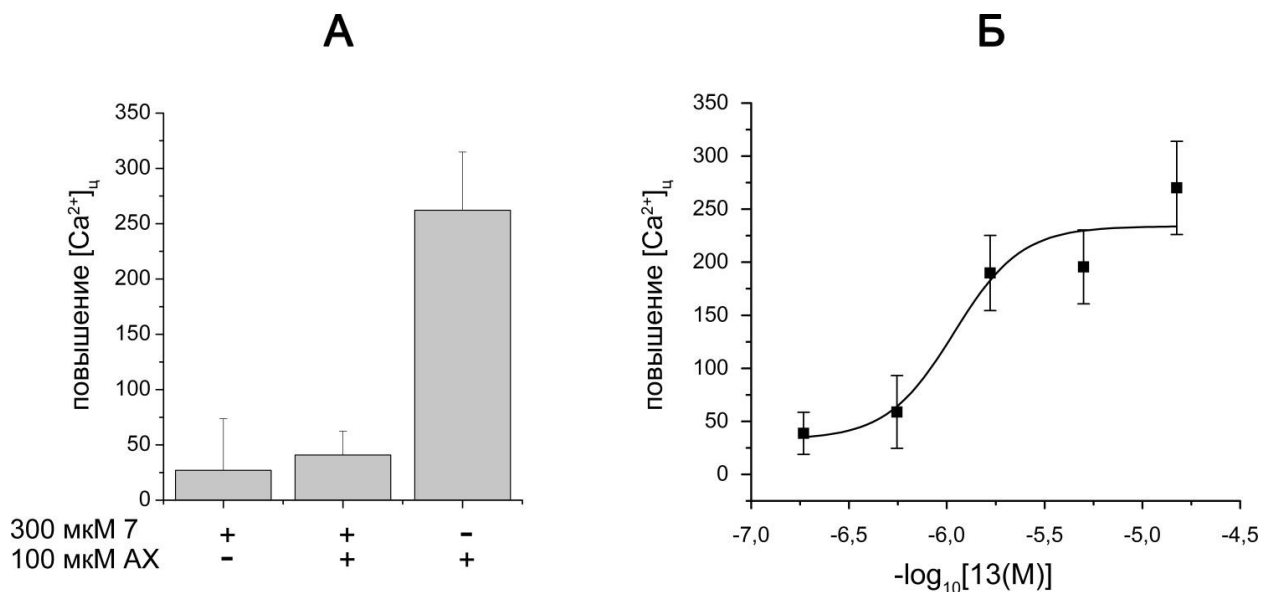


Рис. 5.32 – Кальциевый имиджинг функциональной активности соединений 7 и 13 в отношении человеческого $\alpha 7$ нАХР, экспрессированного в клетках нейробластомы Neuro2a. (А) Блокирование ацетилхолин-индуцированного повышения внутриклеточной концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]_i$) при добавлении 300 мкМ соединения 7. **(Б)** Кривая дозозависимости повышения $[Ca^{2+}]_i$ от концентрации соединения 13. В кальциевом имиджинге все растворы лигандов содержали 10 мкМ PNU120596. Результаты 3 независимых экспериментов приведены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

5.7.3 Алкалоиды из яда кураре племени Matis

Антагонисты мышечного нАХР являются известными недеполяризующими миорелаксантами, блокирующими нервно-мышечную передачу через ингибирование рецепторов на постсинаптической мембране [685]. Подобные миорелаксанты применяют во время анестезии для проведения интубации трахеи и проведения оперативных вмешательств, т.к. практически все операции требуют качественного расслабления поперечно-полосатой мускулатуры. Недеполяризующие миорелаксанты снижают необходимую степень анестезии и позволяют лучше контролировать состояние систем организма. К тому же миорелаксанты нашли применение в травматологии и ортопедии для расслабления мышц при лечении вывихов, переломов, заболеваний спины и связок. Препараты короткого действия в сочетании с общими анестетиками часто используются

²⁶ Совместно с к.б.н. Кудрявцевым Д.С., Лаборатория лиганд-рецепторных взаимодействий ИБХ РАН

для облегчения ларингоскопии, бронхоскопии и эзофагоскопии. Чаще всего миорелаксанты вводятся внутривенно.

Яды кураре на основе экстрактов растений традиционно использовались индейцами Южной Америки, чтобы парализовать и умертвить жертву при попадании стрелы с ядом. В начале – середине XX века сначала яд кураре, а затем его основное действующее вещество – *d*-тубокурарин, выделенный из *Chondodendron tomentosum*, был введен в клиническую практику как миорелаксант при проведении операций [697]. В настоящее время используются его более эффективные и безопасные аналоги, однако и они не лишены ряда побочных эффектов. Так, нежелательные побочные эффекты в первую очередь связаны с их эффектами на вегетативную нервную систему и провокацией выделения гистамина. Причиной этих эффектов является недостаточная селективность низкомолекулярных недеполяризующих миорелаксантов для нАХР мышечного типа. Кроме того, ряд эффектов связаны с ингибированием или активацией мускариновых АХР [698, 699]. Поэтому необходимы дополнительные исследования ключевых структурных элементов миорелаксантов, важных для их высокой селективности. В дополнение к высокой селективности, идеальный релаксант должен характеризоваться быстрым началом действия и короткой или промежуточной продолжительностью действия [700-702].

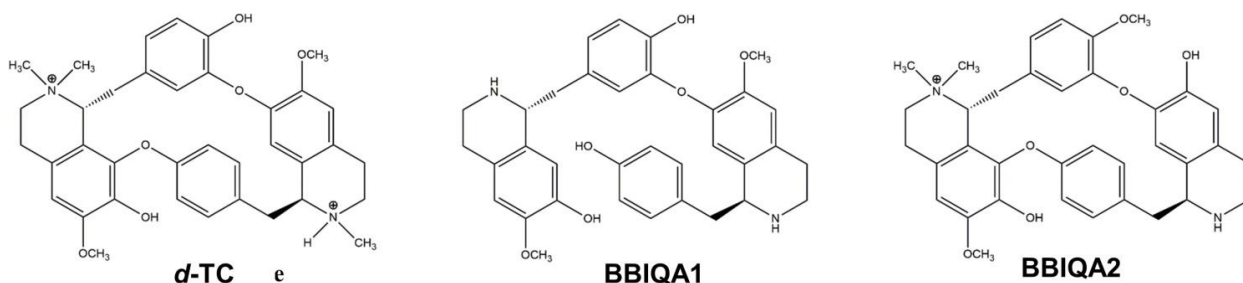


Рис. 5.33 – Химические формулы *d*-тубокурарина (*d*-TC) и новых выделенных алкалоидов BBIQA 1, 2 (bisbenzyltetrahydroisoquinoline alkaloids).

До настоящего времени кураре-подобные яды рассматриваются как источник новых фармакологически-перспективных соединений. Задачей этого этапа работы стала детальная характеристика взаимодействия ряда новых алкалоидов BBIQA 1, 2 (bisbenzyltetrahydroisoquinoline alkaloids), выделенных из яда кураре бразильского племени Матис, с Cys-петельными рецепторами (Рис. 5.33, 5.34). Проводилось сравнение активности BBIQA 1, 2 и их структурного аналога *d*-тубокурарина (Рис. 5.33, 5.34), хорошо изученного ингибитора нАХР и других Cys-петельных рецепторов. Согласно данным литературы *d*-тубокурарин способен блокировать нАХР как конкурентно, так и

неконкурентно, в зависимости от подтипа рецептора. Так, ингибирование нейронального $\alpha 4\beta 2$ нАХР является конкурентным, в то время как мышечный тип и нейрональные $\alpha 7$ и $\alpha 3\beta 4$ нАХР ингибируются по смешанному механизму, включающему связывание как с ортостерическим, так и с аллостерическим сайтами рецептора [464]. Также *d*-тубокурарин с высоким сродством взаимодействует с ацетилхолин-связывающим белком (АХСБ), являющимся хорошей моделью для изучения связывания агонистов и конкурентных антагонистов с ортостерическим сайтом в экстрацеллюлярном домене нАХР [27]. Рентгеноструктурный анализ показал, что *d*-тубокурарин принимает три различные ориентации в сайтах связывания лиганда АХСБ [703], что, вероятно, и обеспечивает широкий спектр мишеней его действия. В дополнение к нАХР *d*-тубокурарин является эффективным блокатором 5-НТЗ рецептора серотонина ($IC_{50} = 11,4\text{--}13$ нМ при связывании с мышинным и 1,8 мкМ – с человеческим рецепторами, соответственно [704, 705], а при концентрациях выше 30 мкМ он также ингибирует ГАМК_A-рецепторы [706].

Таблица 5.4 – Значения параметров IC_{50} взаимодействия *d*-тубокурарина (*d*-ТС) и его аналогов ВВІQA 1 и ВВІQA 2 с АХСБ *A. californica*, нАХР мышечного типа *T. californica*, мышечным $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ нАХР, $\alpha 7$ нАХР и серотониновым рецептором 5-НТЗ_{3A}P, полученные методами конкурентного радиолигандного анализа, кальциевого имиджинга и электрофизиологии.

Соединение	Радиолигандный анализ		
	АХСБ <i>A. californica</i> IC_{50} , мкМ (95% ДИ)	нАХР <i>T. californica</i> IC_{50} , мкМ (95% ДИ)	$\alpha 7$ нАХР IC_{50} , мкМ (95% ДИ)
<i>d</i> -ТС	2,41 (2,26 – 2,56)	0,39 (0,31 – 0,47)	7,77 (6,72 – 8,81)
ВВІQA 1	3,80 (3,47 – 4,13)	26,3 (24,7 – 27,8)	162 (148 – 191)
ВВІQA 2	7,63 (5,28 – 9,97)	8,75 (7,22 – 10,27)	5,52 (4,50 – 6,55)
Соединение	Кальциевый имиджинг		Электрофизиология
	$\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ нАХР IC_{50} , мкМ (95% ДИ)	$\alpha 7$ нАХР* IC_{50} , мкМ (95% ДИ)	5-НТЗ _{3A} P IC_{50} , нМ (95% ДИ)
<i>d</i> -ТС	0,81 (0,50 – 1,12)	2,03 (1,31 – 2,76)	22,63 (10,49 – 34,78)
ВВІQA 1	0,75 (0,28 – 1,21)	1,70 (1,11 – 2,61)	119,4 (74,4 – 164,4)
ВВІQA 2	1,75 (0,88 – 2,61)	3,08 (1,47 – 4,68)	1975 (1861 – 2090)

*в экспериментах все растворы лигандов содержали 10 мкМ PNU-120596; 95% ДИ – 95% доверительный интервал.

Все протестированные вещества (ВВІQA 1, 2) были способны конкурировать с [¹²⁵I]- α Bgt за связывание с АХСБ *A. californica* столь же успешно как и *d*-тубокурарин (IC_{50} в

диапазоне 2,41 – 7,63 мкМ), однако они заметно уступали (IC_{50} в диапазоне 8,75 – 26,3 мкМ) в аффинности *d*-тубокурарину ($IC_{50} = 0,37$ мкМ) при взаимодействии с полноразмерным нАХР мышечного типа $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$ ската *T. californica* (Таблица 5.4)²⁷. При связывании же с $\alpha 7$ нАХР человека особо низкой аффинностью отличался ВВІQA 1 ($IC_{50} = 162$ мкМ), а дозозависимости для *d*-тубокурарина и ВВІQA 2 оказались весьма схожи ($IC_{50} = 7,77$ и $5,52$ мкМ, соответственно)²⁷. Хорошо известно, что α Bgt взаимодействует с ортостерическими сайтами связывания агонистов и конкурентных антагонистов мышечного и $\alpha 7$ нАХР, расположенными между субъединицами в экстрацеллюлярном домене рецепторов [707]. Полученные результаты показывают, что алкалоиды ВВІQA менее эффективно связываются с этими сайтами, чем *d*-тубокурарин.

В функциональном же тесте кальциевого имиджинга новые алкалоиды ВВІQA 1 и 2 были весьма сходны с *d*-тубокурарином (IC_{50} в диапазоне 0,75 – 1,75 мкМ) по эффективности ингибирования как мышечного $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ нАХР мышцы, который отличается на одну субъединицу ϵ от «незрелого» рецептора *T. californica* $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$ (Таблица 5.4, Рис. 5.34А), так и $\alpha 7$ нАХР человека (IC_{50} в диапазоне 1,7 – 3,08 мкМ) (Таблица 5.4, Рис. 5.34Б). В сравнении с результатами конкурентного радиолигандного анализа данные кальциевого имиджинга говорят о сложном механизме ингибирования функционального ответа рецепторов как *d*-тубокурарином, так и ВВІQA 1, 2. Объяснением может служить связывание алкалоидов с различными как ортостерическими, так и аллостерическими сайтами мультисубъединичных нАХР, расположенными в их экстрацеллюлярном и трансмембранном доменах [708, 709]. Для *d*-тубокурарина такой комплексный механизм взаимодействия был показан ранее [710-712]. Нами дополнительно был проведен эксперимент кальциевого имиджинга по изучению влияния возрастающих концентраций *d*-тубокурарина и ВВІQA 1 и 2 на форму кривой дозозависимости ответа мышечного $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ нАХР на добавление ацетилхолина. При возрастающих концентрациях всех трех соединений наблюдалось не только увеличение EC_{50} ацетилхолина, т.е. сдвиг соответствующей кривой вправо, что можно ожидать при классическом конкурентном характере ингибирования, но также и снижение амплитуды кальциевого клеточного ответа, что служит указанием на неконкурентный компонент механизма ингибирования. Полученные результаты конкурентного радиолигандного анализа и кальциевого имиджинга свидетельствуют, что аналогичный комплексный механизм взаимодействия может быть характерен и для связывания ВВІQA 1 с $\alpha 7$ нАХР.

²⁷ Совместно с д.х.н. Кашеверовым И.Е., руководителем Лаборатории лиганд-рецепторных взаимодействий ИБХ РАН

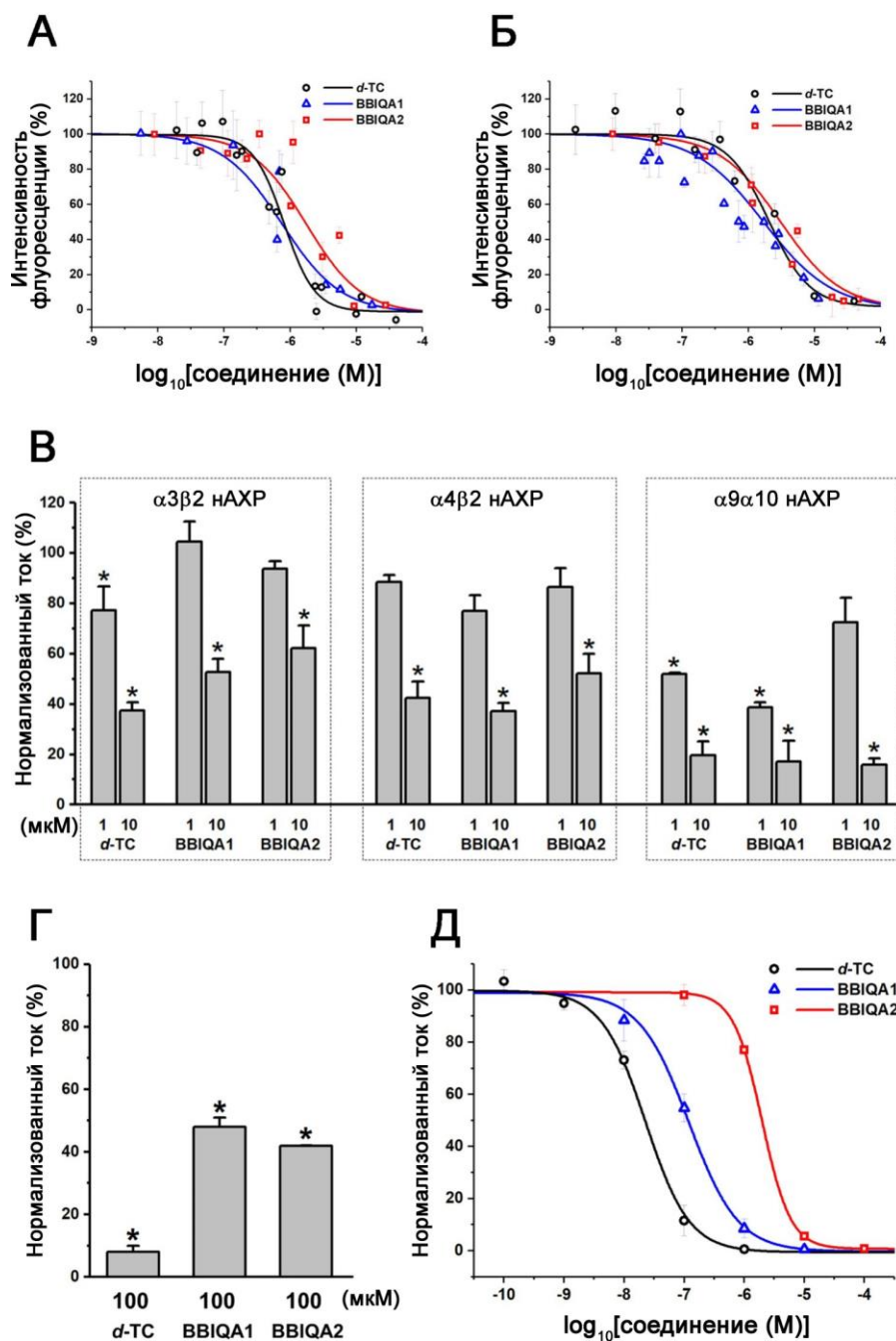


Рис. 5.34 – Ингибирующее действие *d*-тубокурарина (*d*-ТС), ВВІQA 1 и ВВІQA 2 на Cys-петельные рецепторы: (А) мышечный $\alpha 1\beta 1\varepsilon\delta$ nAХP мыши, (Б) $\alpha 7$ nAХP человека, (В) нейрональные гетеромерные nAХP ($\alpha 3\beta 2$ nAХP человека, $\alpha 4\beta 2$ nAХP крысы и $\alpha 9\alpha 10$ nAХP человека), (Г) $\alpha 3\beta 2\gamma 2$ ГАМК_A-рецептор мыши и (Д) серотониновый рецептор мыши (5HT3A подтипа), гетерологически экспрессированные в клетках Neuro2a или ооцитах шпорцевой лягушки. Для детектирования повышения внутриклеточной концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]_i$) в клетках Neuro2a использовали (А) 30 мкМ АХ и (Б) 10 мкМ АХ (в присутствии 10 мкМ PNU120596). Ионные токи в ооцитах шпорцевой лягушки были индуцированы (В) никотином (50 мкМ ($\alpha 3\beta 2$ nAХP) и 10 мкМ ($\alpha 4\beta 2$ nAХP)) и 25 мкМ АХ ($\alpha 9\alpha 10$ nAХP), (Г) 100 мкМ ГАМК и (Д) 1 мкМ серотонина. Данные приведены как среднее \pm стандартная ошибка среднего ($n = 3 - 5$). Значения IC_{50} приведены в Таблице 5.4. * $p < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ с тестом Tukey), сравнивались нормализованные значения ионного тока, опосредованного активацией исследуемого рецептора, при наличии и отсутствии антагониста.

Стоит отметить, что в соответствии с микромолярными константами ингибирования мышечного nАХР алкалоидами ВВІQA 1, 2, они не могут считаться высокоаффинными антагонистами для этого подтипа рецептора, также как и для $\alpha 7$ nАХР (Таблица 5.4). Однако было выявлено, что именно низкоаффинные лиганды обладают быстрым началом и короткой или средней продолжительностью миорелаксантного действия, что и требуется для разработки эффективного лекарственного средства [702, 713, 714]. Следовательно, невысокая аффинность алкалоидов ВВІQA может рассматриваться как положительная характеристика с точки зрения их потенциальных лекарственных свойств, что обосновывает проведение дальнейшего структурно-функционального анализа этих соединений.

С применением электрофизиологического анализа изучалось взаимодействие *d*-тубокуарина, ВВІQA 1, 2 с гетеромерными $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 4\beta 2$ и $\alpha 9\alpha 10$ nАХР при их экспрессии в ооцитах *X. laevis*. Как видно из Рис. 5.34В все три исследованные соединения имеют сходное родство к каждому из гетеромерных подтипов рецептора (Таблица 5.4).

Однако уже в отношении $\alpha 3\beta 2\gamma 2$ ГАМК_A-рецептора мыши ВВІQA 1 и 2 заметно уступали *d*-тубокуарину по их ингибирующему действию (Рис. 5.34Г). При этом анализ конкурентной способности всех трех соединений с Alexa Fluor 546-СТХ за связывание с $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ ГАМК_A-рецептором не выявил существенных различий между ними. Стоит отметить, что СТХ способен взаимодействовать как с ортостерическим, так и с аллостерическим сайтами в составе ГАМК_A-рецепторов, что, основываясь на данных электрофизиологического и флуоресцентного анализа, может быть справедливым также и для ВВІQA 1, 2.

Еще более значительная разница в ингибирующей способности для *d*-тубокуарина и ВВІQA 1 и 2 наблюдалась при реакции с 5-НТ3А-рецептором серотонина (Рис. 5.34Д). Электрофизиологически было выявлено, что если IC_{50} для *d*-тубокуарина составляло всего 22,63 нМ, то это значение для ВВІQA 1 и 2 равнялось 119,4 и 1975 нМ, соответственно (Таблица 5.4). Таким образом, эти новые алкалоиды были в 5 и 87 раз, соответственно, менее активными, чем *d*-тубокуарин в отношении серотонинового 5-НТ3А-рецептора. Это найденное свойство может оказаться весьма ценным для их лекарственного потенциала и последующего рационального дизайна лекарственных средств, т.к. перекрестное воздействие на $\alpha 7$ nАХР и 5-НТ3А-рецептор является весьма проблематичным для соединений, проходящих стадии доклинических и клинических испытаний.

Вероятно, более ярко выраженная специфичность новых компонентов ВВІQA яда кураре в отношении nAХР, но не структурно-подобных рецепторов, повысит их фармакологический потенциал либо позволит применить их формулы для проведения дальнейших направленных структурных модификаций.

5.8 Доклинические исследования эффективности и безопасности лекарственного средства на основе синтетического пептида аземиопсина в качестве миорелаксанта

Мышечные релаксанты пептидной природы могут рассматриваться как альтернатива низкомолекулярным алкалоидам, обладающим большим числом нежелательных побочных эффектов, а также ботулиническому токсину, который является основным лекарственным препаратом для облегчения состояния при мышечных дистониях и спастической форме детского церебрального паралича. Его применяют в виде инъекций в мышцы, вовлеченные в гиперкинез. В 1989 г. «Ботокс» (один из препаратов на основе ботулотоксина) был одобрен FDA для лечения блефароспазма, в 2000 г. – цервикальной дистонии (спастической кривошеи), в 2010 г. – мышечной спастичности в локте, запястье и пальцах. Клинический эффект достигается в 85–90% случаев и сохраняется 2 – 3 месяца. Как правило, больные нуждаются в регулярных повторных введениях препарата ботулинического токсина. При очевидной эффективности подобных препаратов нельзя забывать о сильной токсичности ботулинического токсина, а также таких нежелательных побочных эффектах как зуд, жжение, отеки в местах введения препарата, общая мышечная слабость, образование антител и невозможность оперативно корректировать дозу препарата в соответствии с индивидуальной переносимостью.

Пептиды не относятся к ксенобиотикам и, как правило, обладают высокой селективностью к конкретным мишеням, что обусловлено самой природой пептидно-белковых взаимодействий. Естественным источником высокоселективных пептидов всегда было яды животных, особенно моллюсков и змей. В настоящей работе были проведены доклинические исследования эффективности и безопасности лекарственного средства (Az) на основе линейного 21-членного пептида аземиопсина (DNWWPKPPHQGPRPPRPRPKP), выделенного из яда гадюки *Azemiops feae*, в качестве мышечного релаксанта периферического действия [715]. Этот пептид является высокоаффинным и селективным ингибитором nAХР мышечного типа и легко синтезируется химически.

5.8.1 Специфическая активность Az *in vitro*

Ранее в экспериментах по конкурентному радиолигандному анализу с использованием ^{125}I - αBgt , аземиопсин продемонстрировал высокое сродство к нАХР мышечного типа ската *Torpedo* ($\text{IC}_{50} = 0,18 \pm 0,03$ мкМ) и более низкую эффективность связывания с $\alpha 7$ нАХР человека ($\text{IC}_{50} = 22 \pm 2$ мкМ) [715]. В настоящем исследовании методом кальциевого имиджинга мы обнаружили, что Az является высокоаффинным ингибитором функциональной активности мышечного нАХР мыши (Рис. 5.35А, $\text{IC}_{50} = 19 \pm 8$ нМ) и менее эффективным для $\alpha 7$ нАХР человека (Рис. 5.35Б, $\text{IC}_{50} = 2,67 \pm 0,02$ мкМ). Следует отметить, что соответствующие клеточные кальциевые ответы были вызваны добавлением АХ в концентрациях 30 мкМ (EC_{100} для мышечного нАХР) и 10 мкМ (EC_{50} для $\alpha 7$ нАХР), соответственно. Для обоих видов нАХР Az был более эффективен, чем известный недеполяризующий миорелаксант рокуроний, для которого константы ингибирования мышечного и $\alpha 7$ нАХР в тесте кальциевого имиджинга составляли $257,06 \pm 95,54$ нМ и $25,69 \pm 4,5$ мкМ, соответственно (Рис. 5.36А, Б, соответственно). К тому же Az был более селективен в отношении мышечного типа рецептора: соотношение констант ингибирования $\alpha 7$ и мышечного нАХР составляло для Az 140:1 против 100:1 для рокурония. В целом полученные данные согласуются с более ранними результатами.

Электрофизиологические эксперименты не обнаружили влияния Az (в концентрациях до 50 мкМ) на ионные токи, опосредованные активацией гетеромерных нейрональных $\alpha 4\beta 2$ нАХР крысы при воздействии 20 мкМ никотина (Рис. 5.35В). Кроме того, Az (в концентрациях до 100 мкМ) оказался не активен в отношении гетеромерных $\alpha 3$ -содержащих нАХР ($\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ и др.) клеток нейробластомы SH-SY5Y человека (Рис. 5.35Е). В контрольных экспериментах с использованием той же клеточной системы, кальциевые ответы, вызванные добавлением 100 мкМ никотина ($\text{EC}_{50} = 22$ мкМ, Рис. 5.35Г), успешно ингибировались с помощью α -конотоксина МП (Рис. 5.35Д, $\text{IC}_{50} = 60 \pm 4$ нМ), специфического антагониста $\alpha 3$ -содержащих нАХР. В более раннем исследовании также было показано, что Az не проявляет активности против серотониновых 5-НТЗ рецепторов при концентрации до 10 мкМ и не воздействует на ГАМК_A-рецепторы ($\alpha 1\beta 3\gamma 2$ и $\alpha 2\beta 3\gamma 2$ субъединичного состава) в концентрации до 100 мкМ [715]. В целом, эти данные продемонстрировали высокую селективность действия Az на мышечный нАХР. Следует отметить, что клинически используемые недеполяризующие миорелаксанты в низких микромолярных концентрациях ингибируют такие нейрональные подтипы нАХР, как $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$ [464]. В наших опытах рокуроний дозозависимо блокировал нейрональные $\alpha 3$ -содержащие нАХР клеточной линии нейробластомы человека SH-SY5Y

(Рис. 5.36В). Так, уже при концентрации 5 мкМ степень ингибирования составляла >30% (Рис. 5.36В). Таким образом, Az более избирателен к нАХР мышечного типа, чем клинически используемый миорелаксант, что может обуславливать меньшее число нежелательных побочных эффектов в организме.

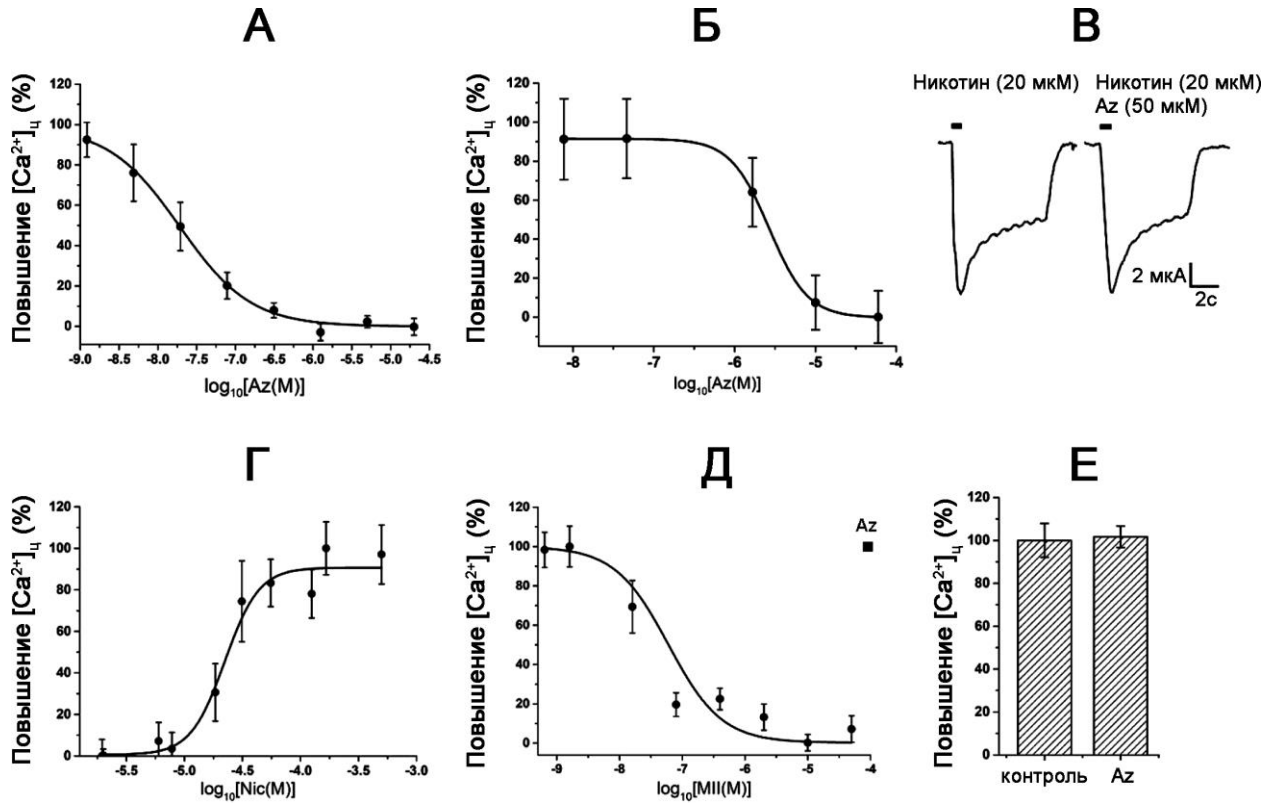


Рис. 5.35 – Взаимодействие Az с мышечными и нейрональными нАХР. Кривые ингибирования Az АХ-индуцированного (30 и 10 мкМ) внутриклеточного повышения концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]_i$) в клетках нейробластомы Neuro2a, экспрессирующей (А) мышечный $\alpha 1\beta 1\varepsilon\delta$ и (Б) $\alpha 7$ нАХР, соответственно. (В) Примеры ионных токов, проходящих через $\alpha 4\beta 2$ нАХР в ответ на добавление никотина. (Г) Кривая дозозависимости клеточных ответов нейробластомы человека SH-SY5Y, экспрессирующей $\alpha 3$ -содержащие нАХР, на добавление различных концентраций никотина. Оценивалась амплитуда повышения внутриклеточной концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]_i$). (Д) Кривая ингибирования α -конотоксином МП повышения $[Ca^{2+}]_i$ в клетках SH-SY5Y, экспрессирующих $\alpha 3$ -содержащие нАХР, в ответ на воздействие 100 мкМ никотина. Не было обнаружено ингибирующего действия Az на вызванные аппликацией никотина (В) ионные токи и (Е) кальциевые ответы, опосредованные активацией $\alpha 4\beta 2$ и $\alpha 3$ -содержащих нАХР, соответственно ($p > 0,05$, U-критерий Манна-Уитни). Данные приведены как среднее \pm стандартная ошибка среднего по результатам 4 независимых опытов.

Электрофизиологические эксперименты, направленные на поиск активного центра аземиопсина, выявили, что пентапептид WWPKP обладает наибольшей ингибирующей активностью по отношению к мышечному нАХР (степень ингибирования $\sim 70\%$ при

использовании 150 мкг/мл концентрации пентапептида) в сравнении с другими перекрывающимися пентапептидными фрагментами Az.

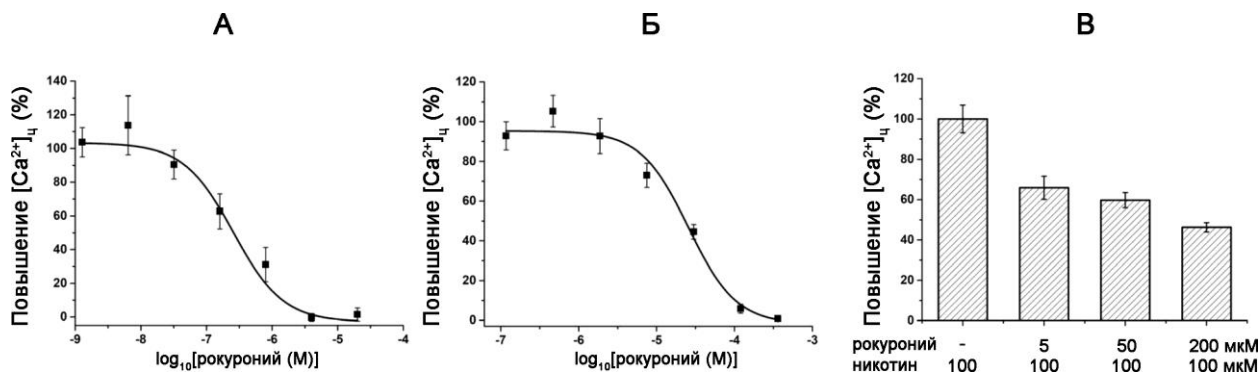


Рис. 5.36 – Взаимодействие рокурония с мышечными и нейрональными nAChR. Кривые ингибирования рокуронием АХ-индуцированного (30 и 10 мкМ) внутриклеточного повышения концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]_{ц}$) в клетках нейробластомы Neuro2a, экспрессирующих (А) мышечный $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ и (Б) $\alpha 7$ nAChR, соответственно. (В) Ингибирование рокуронием (5 – 200 мкМ) повышения $[Ca^{2+}]_{ц}$ в клетках SH-SY5Y, экспрессирующих $\alpha 3$ -содержащие nAChR, в ответ на воздействие 100 мкМ никотина. Данные приведены как среднее \pm стандартная ошибка среднего по результатам 4 независимых опытов.

5.8.2 Специфическая миорелаксанта́нная активность Az

Для изучения специфической миорелаксанта́нной активности Az изучали его влияние на мышечную силу самцов мышей линии ICR²⁸. Для этого использовали тест по измерению силы захвата планки прибора передними конечностями животного, который является широко используемым неинвазивным методом для количественной объективной оценки мышечной силы мышей и крыс при исследовании патологических состояний и веществ, влияющих на нервно-мышечную передачу. В основе теста лежит естественная реакция грызуна, хватающего планку или решетку, когда его удерживают за хвост [716, 717]. Однократное введение Az в трицепсы передних конечностей в дозах 0,03, 0,1 и 0,3 мг/кг вызывало статистически достоверное дозозависимое снижение силы захвата передними конечностями измерительного прибора (Рис. 5.37), меньшие дозы Az были неэффективны. Эффект был очевиден через 5 минут после введения и длился в течение 25–55 мин в зависимости от дозы. Для сравнения мы проверили недеполяризующий миорелаксант рокуроний и обнаружили, что он сильно уступал Az при измерении силы захвата у мышей (Рис. 5.38). Так, расслабляющий эффект от введения рокурония наступал очень быстро и исчезал уже через 5 минут после инъекции. Статистически достоверную

²⁸ Совместно с проф. Мурашевым А.Н. и н.с. Лобановым А.Н., Лаборатория биологических испытаний ФИБХ РАН

разницу от контрольных значений удалось наблюдать только при использовании дозы рокурония 0,1 мг/кг на второй минуте после инъекции, т.к. доза 0,13 мг/кг была летальной для мышей, а при введении 0,08 мг/кг полученные значения почти не отличались от контрольных. Сравнение полученных результатов с известными данными для другого недеполяризующего миорелаксанта, панкурония, также продемонстрировало большую эффективность Az. В дозе 0,1 мг/кг (промежуточная использованная доза) расслабляющий эффект от введения Az и панкурония составлял 37% и 24,1%, соответственно [717]. Однако, принимая во внимание 4,4-кратную разницу их молекулярных масс, Az гораздо более активен, чем панкуроний (доза 0,1 мг/кг соответствует 39 и 175 нмоль/кг, соответственно). В аналогичном тесте ботулинический нейротоксин вводили внутримышечно крысам [700]. Он оказался очень активным и расслабляющий эффект был весьма продолжительным: при инъекции 0,24 U нейротоксина на протяжении 14 дней не наблюдался возврат мышечной силы до контрольных значений [700]. Такое длительное нарушение мышечной функции может быть чрезмерным в ряде практических применений.

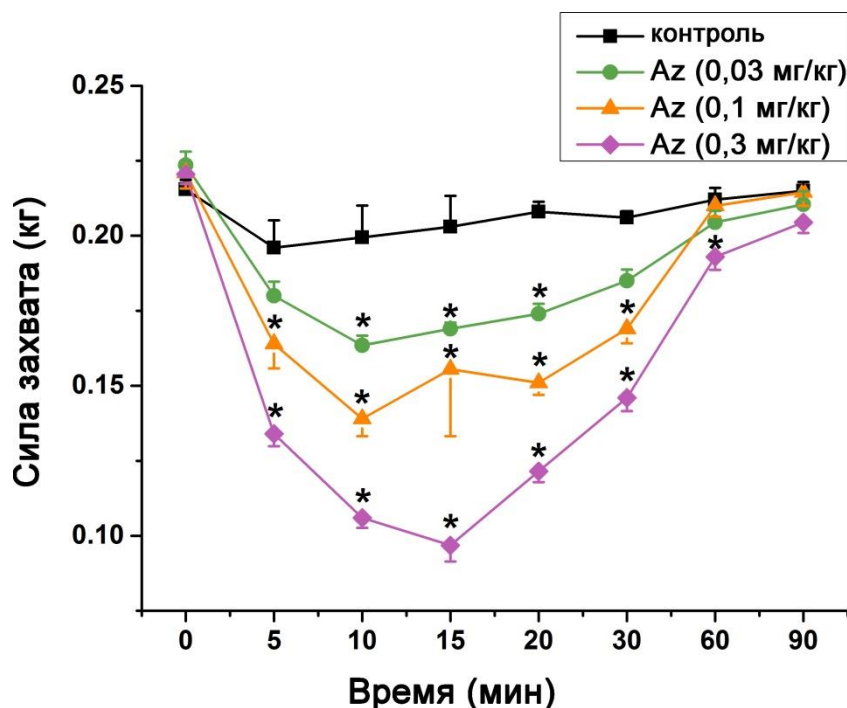


Рис. 5.37 – Миорелаксанта́ный эффект Az. Временная зависимость изменения силы захвата планки измерительного прибора передними конечностями самцов мышей ICR через 0 – 90 мин после в/м введения Az (0,03, 0,1 и 0,3 мг/кг) или физиологического раствора (контроль). Результаты представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка среднего, $n = 10$. Статистически достоверные различия в мышечной силе передних конечностей были выявлены между контрольной и экспериментальной группами ((one way repeated measures ANOVA, * $p < 0,05$)).

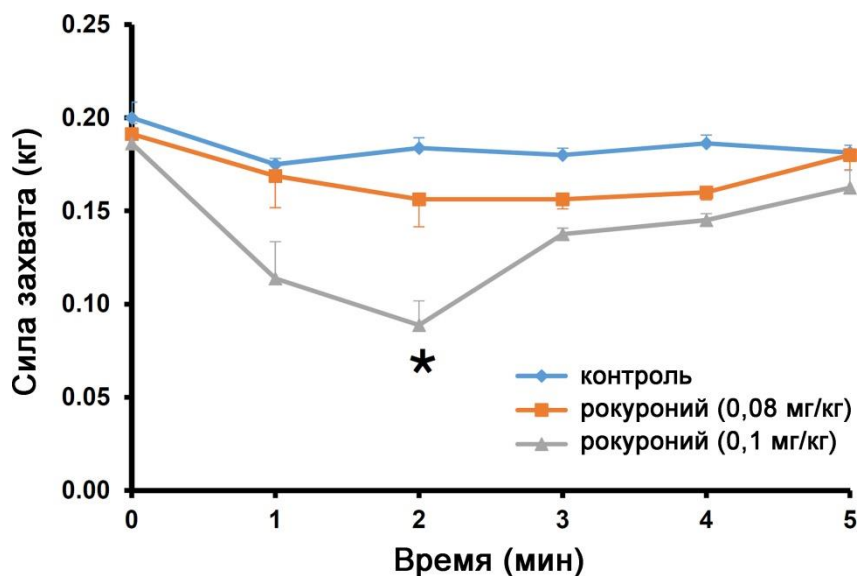


Рис. 5.38 – Миорелаксанта́ный эффект рокурония. Временная зависимость изменения силы захвата планки измерительного прибора передними конечностями самцов мышей ICR через 0 – 5 мин после в/м введения Az (0,08, 0,1 мг/кг) или физиологического раствора (контроль). Результаты представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка среднего, $n = 4$. Статистически достоверные различия в мышечной силе передних конечностей были выявлены между контрольной и экспериментальной группами (one way repeated measures ANOVA, * $p < 0,05$).

5.8.3 Фармакокинетика Az

На следующем этапе работы проведено изучение фармакокинетики Az в радиоактивной (^{125}I -меченной) форме при его при однократном внутривенном (в/в) и внутримышечном (в/м) введении в дозах 0,25 и 0,50 мг/кг мышам ICR²⁹. Для оценки процессов выведения и элиминации препарата были определены основные фармакокинетические параметры Az, такие как площадь под фармакокинетической кривой (AUC (0→t)), максимальная концентрация пептида в крови (C_{max}) и период его полувыведения $T_{1/2}$ (Таблица 5.5).

При внутривенном введении максимальная концентрация (C_{max}) [^{125}I]-Az в крови мышей наблюдалась через 1 минуту после инъекции, а период его полувыведения ($T_{1/2}$) составлял 15 – 20 минут (Рис. 5.39А). При внутримышечном введении максимальная концентрация [^{125}I]-Az (C_{max}) в крови достигалась в течение пяти минут, а параметр $T_{1/2}$ был рассчитан как 20 – 40 минут (Рис. 5.39Б). При обоих способах введения препарат почти полностью удалялся из свободного кровотока в течение 24 часов (Рис. 5.39А, Б).

²⁹ Совместно с проф. Мурашевым А.Н., н.с. Лобановым А.Н. и н.с. Рыковым В.А., Лаборатория биологических испытаний ФИБХ РАН

При внутривенном способе введения наблюдалась более высокая максимальная концентрация препарата (C_{max}), чем при внутримышечном.

Таблица 5.5. Основные фармакокинетические параметры Az при его однократном внутримышечном (в/м) или внутривенном (в/в) введении самцам мышей ICR: площадь под фармакокинетической кривой ($AUC(0 \rightarrow t)$), максимальная концентрация Az в крови мышей (C_{max}) и его период полувыведения $T_{1/2}$.

Способ введения/доза	$AUC(0 \rightarrow t)$, ч × нг/мл	C_{max} , нг/мл	$T_{1/2}$, ч
в/м/0,25 мг/кг	328	278	0,30
в/м/0,50 мг/кг	622	257	0,68
в/в/0,25 мг/кг	214	517	0,26
в/в/0,50 мг/кг	542	745	0,29

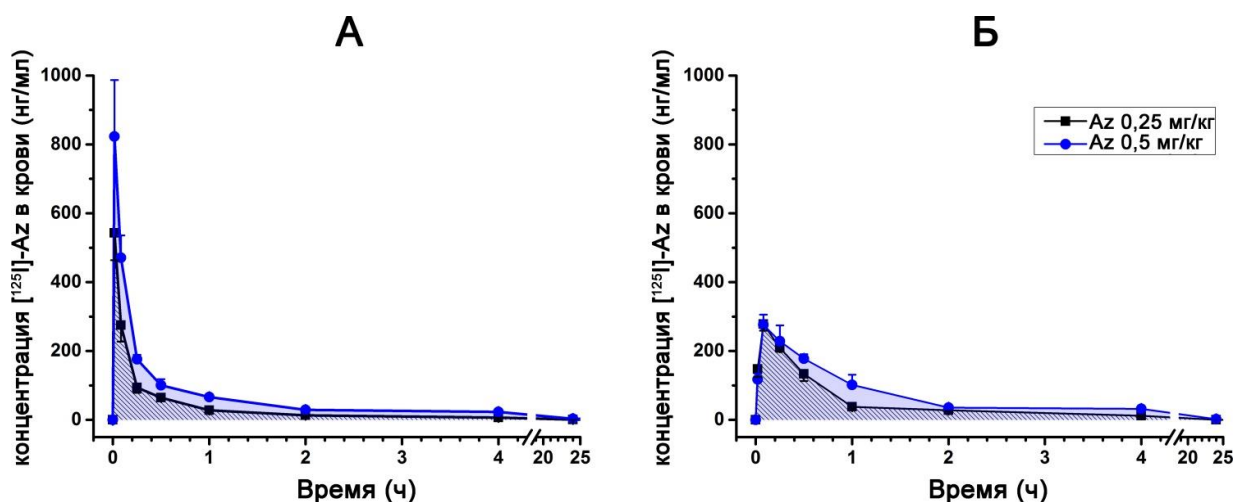


Рис. 5.39 – Фармакокинетические кривые изменения концентрации $[^{125}I]$ -Az в крови самцов мышей ICR через 0 – 24 часа после его (А) внутривенного и (Б) внутримышечного введения в дозах 0,25 и 0,5 мг/кг. Результаты представлены в виде средних значений \pm стандартное отклонение, $n = 5$ (каждая точка графика представляет средние результаты для пяти животных).

Прямое сравнение фармакокинетических параметров Az и других периферически действующих недеполяризующих релаксантов оказалось невозможным, т.к. все имеющиеся литературные данные получены для человека [718, 719]. Недеполяризующие миорелаксанты условно разделяют на препараты с короткой, со средней и с длительной продолжительностью действия. Нельзя забывать, что у мышей очень быстрый обмен веществ и точно отнести Az к какому-то из видов недеполяризующих миорелаксантов не представляется возможным, т.к. классификация разработана для действия на организм человека. По своим фармакокинетическим параметрам Az больше похож на миорелаксанты со средней или даже с длительной продолжительностью действия. Так, его

период полувыведения был оценен в 15 – 40 мин в зависимости от способа введения мышам, в то время как для миорелаксантов средней продолжительности действия у человека этот параметр варьирует от 17 мин (атракурий [720]) до 71 мин (рокуроний [721]). Однако уже пилотные эксперименты на крысах показали, что максимальная концентрация Az в крови при однократном внутримышечном введении достигалась в течение часа, а период его полувыведения увеличивался до 2,5 – 3 часов.

При внутривенном введении 0,25 мг/кг Az его максимальная концентрация в крови мышей составила 0,517 мкг/мл; эта величина составляла около 1 мкг/мл для векурония при введении пациентам дозы 0,2 мг/кг [722]. Следует отметить, что для Az мы наблюдали довольно хорошую корреляцию между временем полувыведения (20 – 40 мин) и длительностью миорелаксанта эффекта (25 – 55 мин) при внутримышечном введении препарата мышам.

5.8.4 Острая токсичность Az

Острая токсичность Az после внутрибрюшинного введения мышам была определена ранее [715], значение ЛД₅₀ составляло $2,57 \pm 0,27$ мг/кг. В настоящей работе была изучена острая токсичность Az при внутривенном и внутримышечном введении мышам ICR³⁰. Значение ЛД₅₀ (в/в) было оценено как $0,51 \pm 0,06$ мг/кг. Для сравнения ЛД₅₀ рокурония при внутривенном введении крысам составляет около 0,3 мг/кг, для (+)-тубокурарина и векурония – 0,11 мг/кг и 0,05 мг/кг при внутривенной инъекции мышам, соответственно [723].

При внутримышечной инъекции ЛД₅₀ и максимальная переносимая доза Az составляли $0,73 \pm 0,13$ и 0,7 мг/кг, соответственно. Внешние признаки интоксикации (нарушение координации движений, потеря мышечного тонуса, снижение моторной активности, нарушение дыхания, снижение реакции на внешние раздражители) появлялись через 5 – 7 минут после введения Az и достигали максимальной интенсивности за 10 – 20 минут. Уже через 60 минут основные признаки интоксикации исчезали, полное же восстановление от токсического действия больших переносимых доз Az происходило через 24 ч. Никаких признаков токсичности не наблюдалось при введении в/м дозы 0,3 мг/кг и ниже, которые использовались в тесте по измерению влияния Az на мышечную силу мышей.

³⁰ Совместно с проф. Мурашевым А.Н. и н.с. Лобановым А.Н., Лаборатория биологических испытаний ФИБХ РАН

Для сравнения была изучена острая токсичность недеполяризующего миорелаксанта рокурония при внутримышечном введении мышам в дозах 0,08, 0,1 и 0,13 мг/кг. Доза 0,08 мг/кг не вызывала видимых признаков токсичности, в то время как 0,1 мг/кг вызывала дискоординацию движений, снижение мышечного тонуса, нарушение походки, снижение или кратковременную потерю двигательной активности, усиление дыхательных движений, вокализацию (у одного животного). Эти признаки токсичности исчезали через 3–4 мин после приема препарата. В дозе 0,13 мг/кг в/м введение рокурония было летальным для животных, в то же время Az в дозе 0,7 мг/кг не вызывал необратимых последствий.

Пентапептид WWPKP, определенный как активный центр Az и демонстрирующий существенное ингибиторное действие на мышечный nAHP, не проявлял острой токсичности при внутрибрюшинном введении самцам мышей линии Balb в дозах до 30 мг/кг включительно и при пероральном применении в дозах до 160 мг/кг включительно.

Таким образом, Az обладает более низкой острой токсичностью по сравнению с клинически применяемым периферически действующим миорелаксантом.

5.8.5 Субхроническая токсичность Az

На основании результатов острой токсичности было проведено исследование токсичности Az при многократном внутримышечном введении в течение 14 дней с последующим периодом отмены самцам и самкам крыс Sprague Dawley³¹. Клинических проявлений интоксикации, связанных с действием препарата в дозах 0,1 и 0,5 мг/кг, у животных на протяжении всего исследования не наблюдалось. Az не влиял на средний прирост массы тела и потребление корма крысами.

14-дневное введение Az в дозе 0,1 мг/кг не привело к каким-либо существенным изменениям гемограммы у экспериментальных животных относительно контрольных. Однако у самцов крыс в дозе 0,5 мг/кг Az вызывал статистически значимое увеличение ($n = 6$, $p < 0,05$, односторонний дисперсионный анализ Краскела — Уоллиса) количества тромбоцитов (810 ± 39 г/л) относительно контрольного уровня (729 ± 22 г/л). Через две недели после окончания терапии уровень тромбоцитов у самцов крыс, получавших Az, был все еще немного увеличен, но незначительно. Различий в гемограммах самок контрольной и экспериментальных групп замечено не было.

³¹ Совместно с проф. Мурашевым А.Н. и н.с. Туховской Е.А., Лаборатория биологических испытаний ФИБХ РАН

Несколько биохимических показателей сыворотки крови крыс были изменены через 14 дней после окончания введения Az в сравнении с контрольными группами животных. После введения Az в дозе 0,5 мг/кг средний уровень триглицеридов в сыворотке крови самцов крыс был статистически достоверно снижен (0,97 ммоль/л против 1,25 ммоль/л в контроле, $n = 6$, $p < 0,05$, односторонний дисперсионный анализ Краскела — Уоллиса). В группе самок крыс, получавших 0,1 мг/кг Az, уровни холестерина ($2,82 \pm 0,36$ ммоль/л против $3,55 \pm 0,39$ ммоль/л в контроле) и кальция ($3,09 \pm 0,06$ против $3,25 \pm 0,09$ ммоль/л в контроле) были также значительно снижены ($n = 6$, $p < 0,05$, односторонний дисперсионный анализ Краскела — Уоллиса).

При некропии животных, проведенной на 15-й день и на 29-й день от начала исследования субхронической токсичности Az, не было обнаружено каких-либо отклонений в анатомии или в абсолютном весе внутренних органов животных. Однако наблюдались некоторые различия в относительной массе сердца самцов крыс. Средняя относительная масса сердца в группе крыс, которым вводили Az в дозе 0,5 мг/кг, была достоверно снижена по сравнению с этим показателем для животных контрольной группы ($0,352 \pm 0,033\%$ против $0,428 \pm 0,086\%$ в контроле, $n = 6$, $p < 0,05$, односторонний дисперсионный анализ Краскела — Уоллиса). Гистологический анализ был выполнен для следующих органов и тканей: печень, желудок, почки, надпочечники, легкие, сердце, селезенка, тимус, подчелюстные лимфатические узлы, яичники, яички, мозг, бедренная мышца правой и левой лап (место инъекции). Патологических изменений в исследуемых органах не наблюдалось.

Все наблюдаемые изменения в биохимических, гематологических и других протестированных параметрах были в рамках физиологически нормальных показателей для крыс Sprague Dawley и не указывают на токсичность Az. Таким образом, при 14-дневном внутримышечном введении Az в дозах 0,1 и 0,5 мг/кг самкам и самцам крыс с двухнедельным периодом отмены данный пептид не проявил токсичности.

5.8.6 Иммунотоксичность Az

На следующем этапе работы определяли иммунотоксичность Az, а именно его способность неблагоприятно воздействовать на функционирование иммунной системы³². Неблагоприятные воздействия на иммунную систему включают снижение в производстве

³² Совместно с проф. Мурашевым А.Н. и м.н.с. Рассказовой Е.А., Лаборатория биологических испытаний ФИБХ РАН

антител, снижение секреции цитокинов, развитие гиперчувствительности и некоторые другие эффекты [724]. Изменения иммунных функций может привести к увеличению частоты или тяжести инфекционных или онкологических заболеваний, так как способность иммунной системы адекватно реагировать на вторжение агентов подавляется. В связи с большим разнообразием иммунных реакций организма необходим комплексный подход для выявления иммунотоксичности потенциального лекарственного препарата. В настоящей работе были проведены следующие тесты:

тест по изучению воздействия препарата на клеточный иммунитет по реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ);

тест по изучению иммунного ответа на введение стандартного антигена;

тест по изучению фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов.

Все три теста были выполнены после 7-дневного внутримышечного введения Az в дозах 0,15 и 0,5 мг/кг самцам мышей ICR. Контрольным животным вводили физиологический раствор.

В первом тесте по изучению воздействия препарата на клеточный иммунитет по реакции ГЗТ мыши были иммунизированы подкожно раствором тринитробензолсульфоновой кислоты (ТНБС, 200 мкл, 10 мМ) в основание хвоста в последний 7-ой день введения Az и физраствора (через 1 час после введения веществ). На 6-е сутки, после первичной иммунизации была проведена вторая (разрешающая) инъекция ТНБС в подушечку левой задней лапы (50 мкл, 10 мМ), в противоположную, контрольную, лапу вводился стерильный физраствор. Через 24 часа после проведения разрешающей инъекции, животные подвергались эвтаназии с последующей регистрацией результатов реакции путем определения массы опытной и контрольной лапы животных. Для всех животных наблюдалось развитие отека экспериментальной лапы, однако введение Az существенно не влияло на степень выраженности отека (Рис. 5.40А), демонстрируя отсутствие заметного влияния на клеточный иммунитет у мышей.

Во втором тесте по изучению иммунного ответа на введение стандартного антигена животных иммунизировали бычьим сывороточным альбумином (БСА) по стандартному протоколу: первично в последний 7-ой день введения Az и повторно через 10 дней. Антиген вводили внутривентрально, при первичной иммунизации – раствор БСА в полном адьюванте Фрейнда (ПАФ), при повторной – в неполном адьюванте Фрейнда (НАФ). На 7-е сутки после повторной инъекции антигена был произведен тотальный забор крови у животных и определены титры антител к антигену стандартным иммуноферментным

анализом (Рис. 5.40Б). Иммунный ответ на БСА как стандартный антиген не был изменен после в/м введения Az в обеих экспериментальных дозах 0,15 и 0,5 мг/кг (Рис. 5.40Б).

В третьем тесте по изучению фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов на следующий день по окончании курса введения Az и физраствора животным внутрибрюшинно вводили по 2 мл суспензии частиц туши. Через 10 мин после введения раствора частиц туши животных подвергали эвтаназии, с последующим выделением клеток перитонеального экссудата из брюшной полости (Рис. 5.40В). Курс внутримышечного введения Az существенно не изменял фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов (Рис. 5.40В).

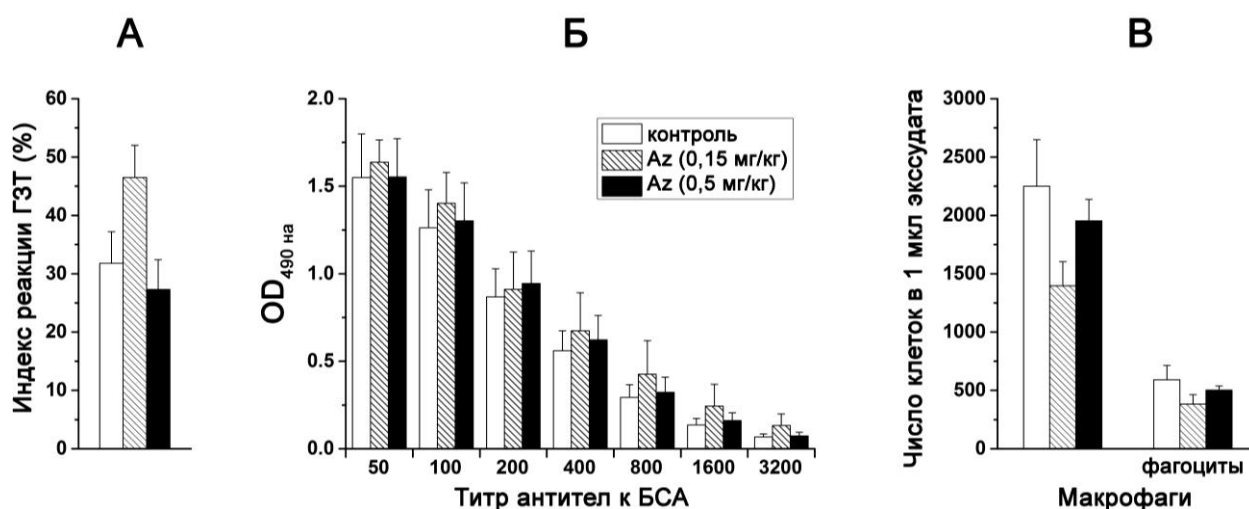


Рис. 5.40 – Влияние Az на функции иммунной системы. Эффект 7-дневного внутримышечного введения Az (0,15 и 0,5 мг/кг) самцам мышей ICR (**А**) на развитие реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) в ответ на инъекцию специфического антигена 10 мМ тринитробензолсульфокислоты, которая проявляется отеком лапы, (**Б**) на их иммунный ответ на стандартный антиген – бычий сывороточный альбумин (БСА) и (**В**) на фагоцитарную активность их перитонеальных макрофагов. (**А**) Представлены средние значения индексов реакций ГЗТ для различных групп животных, отражающие нормированную разницу в весе экспериментальной и контрольной лап мышей. (**Б**) Показаны титры антител (IgG) к БСА в сыворотке крови мышей из экспериментальных и контрольной групп после проведения иммунизации. (**В**) Представлено общее количество макрофагов, а также число фагоцитирующих (поглотивших частицы туши) клеток в 1 мкл экссудата, выделенного из перитонеальной полости экспериментальных и контрольных животных. Во всех трех тестах не было выявлено достоверной разницы в изучаемых параметрах между контрольными и экспериментальными животными ($p > 0,05$, односторонний дисперсионный анализ Краскела — Уоллиса). Результаты представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка среднего, $n = 5 - 10$.

Таким образом, во всех трех проведенных тестах не было обнаружено каких-либо негативных последствий для стандартных функций иммунной системы после недельного внутримышечного введения Az мышам.

5.8.7 Аллергенность Az

Ни в одном из проведенных *in vivo* тестов не было замечено каких-либо признаков аллергических реакций на введение Az у животных. В связи с этим непосредственное тестирование потенциальной аллергенности Az было ограничено проверкой его способности вызывать реакцию гиперчувствительности замедленного типа у мышей ICR обоего пола³³.

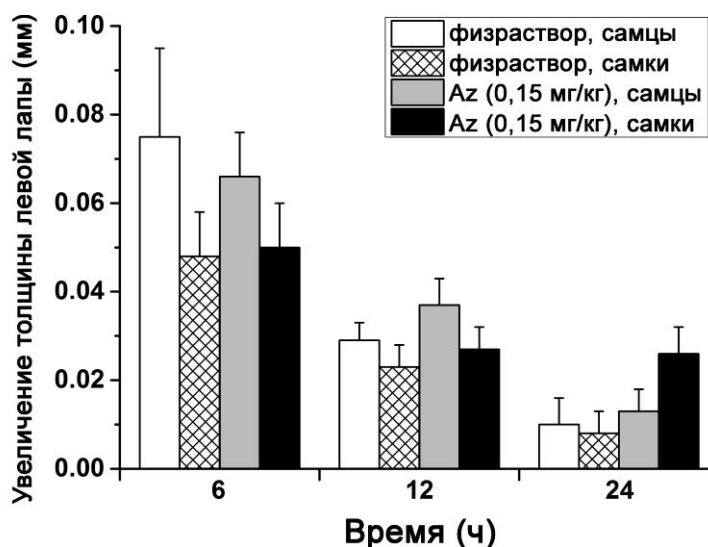


Рис. 5.41 – Способность Az провоцировать аллергическую реакцию (гиперчувствительность замедленного типа, ГЗТ) у самцов и самок мышей ICR при подкожном введении дозы 0,15 мг/кг. Различия в толщине экспериментальной левой (место введение разрешающей (второй) инъекции Az) и контрольной правой задней лапы представлены для групп животных с предварительной сенсибилизацией Az и без нее. Измерения проводились через 6, 12 и 24 ч после разрешающего (второго) введения пептида. Достоверных различий в увеличении толщины левых задних лап не было выявлено у экспериментальных по сравнению с контрольными группами животных ($p > 0,05$, односторонний дисперсионный анализ Краскела — Уоллиса). Результаты представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка среднего, $n = 10$.

Животным опытных групп в основание хвоста однократно вводился Az в дозе 0,15 мг/кг в виде эмульсии в ПАФ. Животным контрольных групп аналогичным образом вводился физиcраствор. Через 5 суток для выявления сенсибилизации к исследуемому препарату проводилась разрешающая инъекция Az животным в подушечку задней левой лапы. Через 6, 12 и 24 часа после разрешающей инъекции регистрировалась интенсивность развития аллергической реакции путем измерения толщины правой и левой задних лап с помощью цифрового штангенциркуля (Рис. 5.41). Интенсивность

³³ Совместно с проф. Мурашевым А.Н. и м.н.с. Рассказовой Е.А., Лаборатория биологических испытаний ФИБХ РАН

реакции гиперчувствительности замедленного типа оценивалась по разнице в толщине задних лап животных. У всех групп животных через 6 ч после разрешающей инъекции наблюдался небольшой отек контактной лапы, который практически исчезал через 24 часа (Рис. 5.41). Следует отметить, что средняя величина отека была одинаковой в группе без предварительной сенсибилизации и с предварительной сенсибилизацией Az (Рис. 5.41).

Таким образом, аллергенности Az также не было выявлено в тесте по индукции реакции гиперчувствительности замедленного типа при использовании дозы 0,15 мг/кг. Следует отметить, что именно введение недеполяризующих миорелаксантов приводит к 50 – 70% аллергических реакций во время анестезии [725]. В этом отношении наиболее опасен суксаметоний, в то время как при использовании панкурония и цисатракурия низка вероятность развития анафилактического шока [725]. В последнее время отмечается повышенная частота развития аллергических реакций на рокуроний [726]. Поскольку аллергических реакций на введение Az не наблюдалось, в этом отношении исследуемый препарат может быть предпочтительнее имеющихся аналогов.

5.8.8 Мутагенность Az

Для выявления мутагенности Az проверялась его способность индуцировать мутации в гене гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (ГГФТ) в линии клеток яичника китайского хомяка СНО-k1³⁴. Это стандартный тест выявления генетических мутаций в клетках млекопитающих [505]. Для проведения тестирования клетки инкубировались в течение четырех часов с Az в концентрациях от 2,8 до 2000 мкг/мл при наличии или отсутствии системы метаболической активации (смесь S9 [727]). Далее клетки культивировали в стандартной ростовой среде в течение 8 дней, а затем пересеивали в среду, содержащую специфический цитостатический агент 6-тиогуанин. Инактивация гена ГГФТ за счет возникновения каких-либо мутаций приводит к устойчивости клеток СНО-k1 к цитостатическому эффекту этого пуринового аналога и позволяет проводить отбор и подсчет колоний мутантных клеток, выращенных в его присутствии.

В качестве положительного контроля использовали два известных мутагенных агента: этилнитрозомочевину (6,25 и 12,5 мкг/мл) и метилхолантрен (2,5 и 5 мкг/мл) при наличии или отсутствии системы метаболической активации. Для определения базового уровня спонтанных мутаций в гене ГГФТ клетки СНО-k1 культивировали в интактной ростовой среде перед их субкультивированием в присутствии 6-тиогуанина. Средняя

³⁴ Совместно с проф. Мурашевым А.Н., н.с. Лобановым А.Н., м.н.с. Салмовой М.А. и н.с. Слащевой Г.А., Лаборатория биологических испытаний ФИБХ РАН

частота спонтанных мутаций была оценена как $25,2 \pm 1,6 \cdot 10^{-6}$. Оба использованных контрольных мутагенных агента вызывали заметное повышение частоты мутаций в гене ГГФТ ($n = 6$, $p < 0,05$, односторонний дисперсионный анализ Краскела — Уоллиса): частота мутаций составляла $33,9 - 39,5 \cdot 10^{-6}$ при использовании этилнитрозомочевины и $35,7 - 45,7 \cdot 10^{-6}$ при использовании метилхолантрена, соответственно. Однако наличие в ростовой среде Az во всех протестированных концентрациях (до 2000 мкг/мл) не вызывало какого-либо значительного увеличения частоты мутаций в гене ГГФТ ($23,5 - 30,2 \cdot 10^{-6}$, $p > 0,05$) по сравнению с базовым уровнем. Таким образом, в этой клеточной системе Az не продемонстрировал мутагенной способности. Стоит отметить, что для рокурония (в концентрациях до 100 мкг/мл) выявлена мутагенность, которая выражалась в возникновении хромосомных перестроек (мутаций) и повышении частоты возникновения микроядер в лимфоцитах периферической крови человека [728]. При этом цитотоксических эффектов не было обнаружено.

5.8.9 Доклинический профиль Az

В настоящей работе был исследован доклинический профиль Az в качестве миорелаксанта, а именно его эффективность *in vitro* и *in vivo*, острая и хроническая токсичность, фармакокинетика, аллергенность, иммунотоксичность и мутагенность. Наши исследования *in vitro* подтвердили высокую аффинность и специфичность Az для мышечного типа нАХР. Его мышечный релаксанта́нный эффект был продемонстрирован при внутримышечном введении мышам в дозах 30 – 300 мкг/кг; наблюдаемая релаксанта́нная активность оказалась выше, чем у клинически используемого миорелаксанта бромида рокурония. Наиболее высокая острая токсичность наблюдалась при внутривенном введении Az, при внутримышечном или внутрибрюшинном введении препарат был менее токсичен. В дозах, вызывающих миорелаксанта́нное действие, признаков токсичности Az не наблюдалось. Токсикологическое исследование при введении мышам показало, что Az хорошо переносится при хроническом дозировании и не проявляет иммунотоксичности, аллергенной или мутагенной активности, что его положительно характеризует по сравнению с имеющимися клинически применяемыми миорелаксанта́ми.

Существуют некоторые общие требования к недеполяризующим мышечным релаксанта́м: идеальный релаксант должен характеризоваться быстрым началом и относительно короткой продолжительностью действия, не оказывать побочного влияния на функционирование сердечно-сосудистой системы, не накапливаться в организме

(метаболизироваться и выводиться из организма), не иметь активных метаболитов, а также иметь доступный и адекватный антагонист [729, 730]. Az удовлетворяет большинству этих требований: это быстродействующий агент с относительно короткой продолжительностью действия, он не накапливается в организме и не имеет активных метаболитов, в качестве его антагониста могут использоваться стандартные клинически применяемые антагонисты недеполяризующих миорелаксантов. Все это позволяет рассматривать Az для возможного применения в качестве недеполяризующего миорелаксанта.

6 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рецепция нейромедиаторов (ацетилхолина, γ -аминомасляной кислоты (ГАМК), глицина, серотонина и др.) лежит в основе электрохимической нервной передачи между возбудимыми клетками в организме человека и животных. Активация ионотропных рецепторов нейромедиаторов или лиганд-управляемых ионных каналов может непосредственно приводить как к развитию и передаче нервного импульса, так и его подавлению. Известными представителями лиганд-управляемых ионных каналов является семейство Cys-петельных рецепторов, которые объединяет консервативное пентамерное трехдоменное строение. К этому семейству относятся никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR), а также рецепторы ГАМК, глицина и серотонина (подтип 5-HT₃). Функциональная роль данных рецепторов не ограничивается участием в синаптической передаче, т.к. Cys-петельные рецепторы часто располагаются на нервных клетках вне синаптических контактов, выполняя регуляторные функции. Клеточная сигнализация с использованием таких молекул как ацетилхолин эволюционно предшествовала развитию электрохимической нервной передачи, что объясняет широкое распространение Cys-петельных рецепторов на невозбудимых клетках как в нервной системе, так и за ее пределами. Для этих рецепторов в последнее время появились данные о возможности дополнительной метаботропной внутриклеточной сигнализации, что еще более усложняет выстраивание общей картины их функциональной роли в организме. Многие аспекты функциональной активности Cys-петельных рецепторов и механизмов узнавания ими лигандов остаются неизученными как из-за чрезвычайно широкого распространения в организме и многообразия их субъединичного состава, так и из-за ограниченности инструментальных подходов.

В настоящей работе был разработан уникальный комбинаторный подход для изучения клеточно-тканевой экспрессии и количественных характеристик функциональной активности Cys-петельных рецепторов. Многие стандартные биохимические методики неприменимы к Cys-петельным рецепторам из-за их трансмембранной локализации, пентамерного строения и высокой гомологичности субъединиц. Например, с использованием тканей нокаутных животных было доказано, что все наиболее широко используемые антитела не способны специфически детектировать субъединицы nAChR при проведении гистохимии или иммуноблоттинга. В настоящей работе впервые был разработан гистохимический протокол для идентификации $\alpha 7$ и мышечного nAChR на основе комбинации высокоселективных флуоресцентно-

меченых и природных трехпетельных α -нейротоксинов змей, специфичность которого была доказана с использованием тканей мышей, нокаутных по гену $\alpha 7$ субъединицы nAHR. Сочетание меченых и природных α -нейротоксинов короткого (60–62 а.о., 4 дисульфидные связи) и длинного (66–75 а.о., 5 дисульфидных связей) типов позволяет решать широкий круг исследовательских задач, но их применимость ограничивается классическими молекулярными мишенями – мышечным, $\alpha 7^*$ и $\alpha 9^*$ nAHR, а также конкурентным механизмом связывания. Расширить круг мишеней позволяет дополнительное применение в флуоресцентном и радиолигандном анализе производных α -конотоксинов моллюсков *Conus*, которые однако отличает чрезвычайно быстрая кинетика диссоциации из комплекса с рецептором, поэтому они не находят широкого применения в качестве маркеров. Многие пробелы анализа функциональных характеристик природных и рекомбинантных Cys-петельных рецепторов удастся удачно восполнить, используя электрофизиологические методики, но они являются весьма трудоемкими и в очень редких случаях применимы для масштабного скрининга новых фармакологически-перспективных соединений или серий мутантных рецепторов. В этом случае более удобен кальциевый имиджинг. В настоящей работе впервые разработан подход кальциевого имиджинга активности рекомбинантных nAHR с применением одноволнового белкового кальциевого сенсора. Основными преимуществами этого метода в сравнении с существующими методиками являются простота протокола и невзыскательность к техническим характеристикам оборудования, стабильность результатов, отсутствие стадии наполнения клеток цитотоксическими агентами, а также проведение временной трансфекции клеток вместо трудоемкого получения стабильных клеточных линий. Далее на всех этапах проведения диссертационной работы применялся разработанный комплексный подход, представляющий собой сочетание флуоресцентного и радиолигандного анализа с использованием пептидно-белковых нейротоксинов, а также метода кальциевого имиджинга и электрофизиологии.

В настоящей работе впервые обнаружено, что трехпетельный α -нейротоксин длинного типа (α -кобратоксин (СТХ)), являющийся классическим конкурентным антагонистом nAHR, ингибирует природные подтипы ГАМК_A-рецептора по смешанному механизму. Как и при действии на nAHR связывание СТХ происходит в классическом (ортостерическом) лиганд-связывающем участке рецептора по конкурентному механизму, наиболее важен для данного взаимодействия положительный заряд центральной петли СТХ. Однако при действии СТХ на ГАМК_A-рецепторы обнаружена и неконкурентная

компонента его связывания, а также гораздо более высокая аффинность к данным рецепторам в сравнении с α -бунгаротоксином и другими трехпетельными токсинами.

Для α -нейротоксинов неконкурентный механизм связывания является исключением, в то же время большинство имеющихся литературных данных свидетельствуют скорее об аллостерической природе активности их структурных аналогов – трехпетельных белков семейства Луб. Секретируемым представителем этих белков является SLURP-1 (81 а.о., 5 дисульфидных связей), выделенный из пептидных библиотек крови и мочи человека, позже обнаруженный в кератиноцитах. Его мутации приводят к развитию редкой наследственной ладонно-подошвенной кератодермии, называемой болезнью острова Меледа, также он участвует в клеточных регуляторных механизмах нервной и иммунной систем. Механизм его действия остается неоднозначным в связи с существенными различиями в опубликованных модулирующих активностях ряда рекомбинантных форм SLURP-1 в отношении nAChR, в основном гомопентамерного $\alpha 7$ подтипа. В настоящей работе впервые показано, что полноразмерный синтетический белок SLURP-1 предпочтительно ингибирует гетеромерные nAChR (наиболее эффективно $\alpha 3\beta 4$ подтип, $IC_{50} = 4,75 \pm 0,78$ мкМ), являясь негативным аллостерическим модулятором $\alpha 7$ и $\alpha 9^*$ nAChR. Широкий круг молекулярных мишеней и средняя аффинность связывания сближает SLURP-1 с родственным белком SLURP-2, а также таким их структурным аналогом среди токсинов как WTX, α -нейротоксин «необычного типа». Как у белков семейства Луб, так и у «необычных» α -нейротоксинов дополнительная пятая дисульфидная связь расположена в первой петле их структуры.

Другим известным среднеаффинным ингибитором ряда nAChR со смешанным механизмом связывания является алкалоид *d*-тубокурарин, первоначально выделенный из *Chondodenron tomentosum*. В середине XX века *d*-тубокурарин был введен в клиническую практику как недеполяризующий миорелаксант при проведении операций. В настоящее время клинически используются его более эффективные и безопасные аналоги, но и они не лишены ряда побочных эффектов из-за недостаточной селективности. В ходе выполнения диссертационной работы были открыты новые структурные аналоги *d*-тубокурарина – алкалоиды ВВІQA из яда кураре племени Матис. В отношении мышечного и ряда нейрональных nAChR ВВІQA1 и 2 проявляли активность, сходную с действием *d*-тубокурарина, но они оказались гораздо более высокоселективными, значительно слабее блокируя родственные 5-HT₃ (в 5 и 87 раз, соответственно) и ГАМК_A-рецепторы. Таким образом, показано, что даже минимальные отличия структур *d*-тубокурарина и ВВІQA2, выражающиеся в различном положении двух метильных групп,

приводят к драматической разнице в их селективности. Вероятно, более ярко выраженная селективность новых компонентов ВВІQА яда кураре в отношении nAХР, но не структурно-подобных рецепторов, повысит их фармакологический потенциал как недеполяризующих миорелаксантов либо позволит применить их формулы для проведения дальнейших направленных структурных модификаций.

Новые знания о характерных чертах $\alpha 7$ nAХР-селективного фармакофора были также получены при анализе свойств его новых специфических «молчащих» агонистов синтетического (производные хинолина) и природного (6-бромогипафорин, выделенный из тканей голожаберного моллюска *Hermisenda crassicornis*) происхождения. «Молчащие» агонисты не способны самостоятельно вызывать активацию $\alpha 7$ nAХР, но приводят к его десенситизации, вследствие чего их агонистическая активность проявляется только в присутствии позитивных аллостерических модуляторов, способных очень сильно снизить скорость десенситизации рецептора. Стандартный фармакофор лигандов $\alpha 7$ nAХР состоит из положительно заряженного атома азота, акцепторной группы водородной связи, расположенной на определенном расстоянии, и ароматической группы, обеспечивающей гидрофобные π - π взаимодействия. Стремясь повысить селективность новых аналогов хинолина к $\alpha 7$ nAХР, в их состав включили азациклические фрагменты, типичные для специфических лигандов этого подтипа никотиновых рецепторов. Кольцо хинолина или изохинолина было присоединено к азациклической группе напрямую или через амидную связь. Структурно-функциональный анализ полученных соединений впервые позволил выяснить критичные черты $\alpha 7$ nAХР-селективного фармакофора у производных хинолина. Так, хинолиновая и азациклическая группы должны быть связаны напрямую, а предпочтительная аффинность к $\alpha 7$ nAХР зависит от наличия 9-членного гетероцикла в составе соединения. Взаимодействие 6-БГФ с идентифицированной мишенью, а именно с человеческим $\alpha 7$ nAХР, впервые описано для гипафорина и его бромированных аналогов. Открытые новые «молчащие» агонисты $\alpha 7$ nAХР потенциально перспективны как противовоспалительные и антиболевы агенты.

В представленной диссертационной работе выявлен ряд новых аспектов физиологической и патофизиологической роли nAХР в процессах ноцицепции (болевого чувствительности) и воспаления. В патофизиологии мигрени внимание традиционно уделялось передаче ноцицептивной информации тройничным чувствительным нервом из оболочек головного мозга, основного места зарождения болевых сигналов, в высшие центры болевой чувствительности в головном мозге. При этом практически не исследована функциональная роль иннервации данных тканей парасимпатической

нервной системой, холинергической по своей природе. До проведения настоящей работы имелись лишь косвенные указания на вероятную роль данной парасимпатической нервной системы и всех ее молекулярных компонентов как в ноцицепции, так и в развитии мигрени. Нами впервые было установлено, что активация никотиновых и мускариновых АХР (в том числе эндогенная) в оболочках головного мозга приводит к усилению болевой сигнализации, воспринимаемой чувствительной ветвью тройничного нерва (*nervus spinosus*). Особого внимания заслуживает обнаруженный аналогичный эффект эндогенного ацетилхолина, высвобождающегося при блокировании активности ацетилхолинэстеразы. Он проявлялся при повышении концентрации провоспалительного нейропептида CGRP, характерной черте патогенеза мигрени. Определены молекулярные мишени наблюдаемого проноцицептивного эффекта ацетилхолина: nАХР и mAХР нервных окончаний ноцицептивных нейронов, иннервирующих мозговые оболочки, а также mAХР тучных клеток, дегрануляция которых приводит к выбросу провоспалительных агентов и цитокинов. Впервые обнаружена предпочтительная экспрессия и аксональный транспорт функционально-активных $\alpha 7$ nАХР, ключевых участников ряда противовоспалительных путей в организме, ноцицептивными нейронами, содержащими пептид CGRP, известный медиатор боли при мигрени. Выделение пептида CGRP на периферии носит провоспалительный характер и, хотя агонисты АХР способны провоцировать его выброс в тканях, совокупность наших и литературных данных свидетельствует о непрямом характере подобной стимуляции. Ранее было показано, что для подобного действия никотина требуется активация симпатических эфферентных нервных окончаний, которая в свою очередь запускает выброс CGRP первичными афферентными нейронами. Таким образом, результатом холинергической нервной передачи в оболочках головного мозга является выброс провоспалительных агентов и цитокинов тучными клетками, выход плазмы крови, возбуждение и сенситизация ноцицептивных афферентных нервных волокон, приводящее к развитию болевых ощущений.

Исследователи все чаще обращают внимание на тесную взаимосвязь функционирования нервной и иммунной систем организма. Ярким примером является «холинергический противовоспалительный рефлекс», опосредованный активацией $\alpha 7$ nАХР макрофагов и других иммунных клеток и приводящий к подавлению их провоспалительной активности в ряде органов. Среди иммунных клеток организма нейтрофилы являются самыми быстрыми и мощными эффекторами острой фазы воспаления, они принимают участие в реакциях врожденного и адаптивного иммунитета,

обладают мощным бактерицидным и фунгицидным действием, продуцируют цитокины и другие биологически активные молекулы. В нашей работе впервые проведено типирование nAHR, модулирующих такие специфические защитные функции нейтрофилов, как продукция активных форм кислорода и адгезия. Обнаружено, что при развитии воспалительной реакции активация $\alpha 7$ и $\alpha 3\beta 2$ (возможно, также $\alpha 6$ -содержащих) nAHR регулирует двухфазным образом выработку нейтрофилами активных форм кислорода и усиливает их клеточную адгезию. Активация nAHR индуцирует кратковременный вход ионов кальция внутрь клетки нейтрофила, запускающий быстрый выброс Ca^{2+} из внутриклеточных депо. В результате повышенная внутриклеточная концентрация ионов Ca^{2+} влияет на целый ряд внутриклеточных процессов в нейтрофилах, включая активацию NADPH-оксидазы и процессы клеточной адгезии.

В представленной диссертационной работе выявлен ряд новых аспектов физиологической и патофизиологической роли nAHR в механизмах нейропластичности мозга. Показано, что функциональная активность nAHR критична для протекания таких процессов нейропластичности, как нейрогенез во взрослом организме и компенсаторные изменения в нигростриатной системе при моделировании болезни Паркинсона. В зубчатой фасции (ЗФ) гиппокампа, отделе мозга ответственном за пространственную и эпизодическую память, нейрогенез продолжается на протяжении всей жизни организма. Довольно хорошо изучены факторы, влияющие на сам процесс постнатального нейрогенеза, но гораздо меньше известно о развитии и интеграции вновь образованных нервных клеток. В представленной диссертационной работе впервые показано, что функциональные $\alpha 7$ nAHR экспрессируются новообразованными нейронами ЗФ гиппокампа грызунов и располагаются на их телах и дендритах. Также впервые обнаружено, что на финальных этапах дифференцировки новых нейронов экспрессия $\alpha 7$ nAHR угнетается. Из полученных результатов можно заключить, что холинергическая сигнализация в ЗФ гиппокампа, приводящая к активации $\alpha 7$ nAHR в новообразованных нервных клетках, необходима для физиологического протекания их дифференцировки и интеграции в сформированную нейрональную сеть у взрослых грызунов.

Патогенез болезни Паркинсона характеризуется прогрессирующей дегенерацией дофаминергических нейронов в базальных ядрах (стриатуме и субстанции Нигра), что приводит к прогрессирующему двигательному расстройству у пациентов. Первые клинические симптомы появляются при гибели 50 – 60% нигростриатных нейронов. Дегенерация нигростриатных дофаминергических нейронов сопровождается изменениями в экспрессии и функциональной активности ряда nAHR, которые способны стимулировать

высвобождение дофамина этими нервными клетками. Особенностью экспериментального дизайна настоящей работы стало использование моделей досимптомной и ранней симптоматической стадий болезни Паркинсона. На этих стадиях данного заболевания в мозге протекают компенсаторные процессы нейропластичности, раскрытие деталей которых может послужить основой для создания новой эффективной нейропротекторной терапии. В настоящей работе впервые показано, что основные компенсаторные изменения в уровне экспрессии $\alpha 4^*$ и $\alpha 7$ nAHP в nigrostriatной системе мышей происходят на досимптомной стадии при моделировании болезни Паркинсона. Уровень же экспрессии $\alpha 6^*$ nAHP, считающегося особенно уязвимым, планомерно уменьшается в соответствии с числом погибших окончаний дофаминергических нейронов. Таким образом nAHP, содержащие $\alpha 4^*$ и $\alpha 7$, но не $\alpha 6^*$ субъединицы, могут опосредовать компенсаторные механизмы нейропластичности на досимптомной стадии болезни Паркинсона.

Cys-петельные рецепторы рассматриваются как важная фармакологическая мишень благодаря их важной роли в таких физиологических процессах в организме как ноцицепция, воспаление, нейрогенез и др., а также в патогенезе ряда заболеваний. Многие фармацевтические компании ведут направленный поиск и дизайн новых агонистов и антагонистов nAHP. В последнее время стартовал ряд клинических испытаний агонистов и позитивных аллостерических модуляторов nAHP для потенцирования когнитивных функций человека при различных нарушениях. «Молчащие» агонисты, ряд которых был открыт в представленной диссертационной работе, считаются перспективными как противовоспалительные и обезболивающие агенты. Структурные аналоги *d*-тубокурарина (новые алкалоиды BBIQA) также обладают фармакологическим потенциалом в качестве недеполяризующих миорелаксантов.

В представленной диссертационной работе были проведены доклинические испытания безопасности и эффективности недеполяризующего миорелаксанта пептидной природы – лекарственного средства на основе синтетического пептида аземиопсина, конкурентного ингибитора мышечного nAHP, первоначально выделенного из яда *Azemiops feae*. На данный момент все клинически применяемые недеполяризующие миорелаксанты являются низкомолекулярными соединениями. В настоящей работе установлено, что по специфической активности и селективности исследуемый препарат превосходит характеристики клинически применяемого недеполяризующего миорелаксанта бромида рокурония. Таким образом, лекарственное средство на основе синтетического пептида аземиопсина перспективно для проведения дальнейшего клинического тестирования.

Таким образом, представленная диссертационная работа является комплексным фундаментальным исследованием, раскрывающим ряд новых аспектов физиологической и патофизиологической роли Cys-петельных рецепторов в организме, молекулярных механизмов узнавания ими лигандов различной природы, а также ранее неизвестных особенностей нАХР-селективного фармакофора низкомолекулярных соединений. Практическая значимость представленного исследования состоит в разработке уникального комплексного подхода для изучения клеточно-тканевой локализации и функциональных характеристик Cys-петельных рецепторов, выяснении новых деталей их функционирования в патофизиологических процессах, открытии их новых фармакологически-перспективных лигандов, а также успешно проведенных доклинических испытаниях безопасности и эффективности недеполяризующего миорелаксанта пептидной природы, конкурентного ингибитора мышечного нАХР.

7 ВЫВОДЫ

- 1) Разработан уникальный комплексный подход для изучения клеточно-тканевой локализации и функциональных характеристик Cys-петельных рецепторов, сочетающий флуоресцентный и радиолигандный анализ с использованием пептидно-белковых нейротоксинов, а также метод кальциевого имиджинга и электрофизиологию.
- 2) Впервые обнаружено, что α -кобратоксин, трехпетельный α -нейротоксин, являющийся классическим конкурентным антагонистом nAHR, ингибирует природные подтипы ГАМК_A-рецептора по смешанному механизму. Впервые показано, что синтетический трехпетельный белок человека SLURP-1 предпочтительно ингибирует гетеромерные $\alpha 3^*$ и $\beta 4^*$ nAHR, являясь негативным аллостерическим модулятором $\alpha 7$ и $\alpha 9^*$ nAHR.
- 3) Впервые установлено, что активация nAHR и mAHR (в том числе эндогенная) приводит к усилению болевой сигнализации в оболочках головного мозга, основном месте зарождения болей при мигрени. Показано, что молекулярными мишенями могут служить nAHR и mAHR ноцицептивных нейронов, а также mAHR тучных клеток. Впервые обнаружена предпочтительная экспрессия $\alpha 7$ nAHR ноцицептивными нейронами, содержащими пептид CGRP, известный медиатор болей при мигрени.
- 4) Установлено, что активация $\alpha 7$, $\alpha 3\beta 2$ и $\alpha 6^*$ nAHR регулирует двухфазным образом специфическую защитную реакцию нейтрофилов мышей при воспалении – выработку активных форм кислорода, а также усиливает их клеточную адгезию.
- 5) Показано, что функциональная активность nAHR критична для таких механизмов нейропластичности, как нейрогенез во взрослом организме и компенсаторные процессы в nigrostriatной системе при моделировании болезни Паркинсона (БП). Впервые обнаружены функциональные $\alpha 7$ nAHR на новообразованных нейронах взрослых грызунов. Впервые установлено, что основные компенсаторные изменения экспрессии nAHR в nigrostriatной системе происходят на досимптомной стадии в модели БП.
- 6) Открыты новые низкомолекулярные среднеаффинные «молчащие» агонисты $\alpha 7$ nAHR природного (6-бромогипафорин) и синтетического (производные хинолина) происхождения, а также антагонисты nAHR со смешанным механизмом связывания (алкалоиды ВВІQA из яда кураре) более селективные, чем их структурный аналог *d*-тубокурарин. Впервые установлено, что присоединение хинолина к 9-членному гетероциклу является критичной чертой $\alpha 7$ nAHR-селективного фармакофора.

7) Доклинические испытания лекарственного препарата на основе синтетического пептида аземиопсина из яда *Azemiops feae*, конкурентного антагониста мышечного nAHP, показали, что в терапевтических дозах он является эффективным и безопасным недеполяризующим миорелаксантом с более высокой селективностью и специфической активностью в сравнении с клинически применяемым препаратом бромидом рокурония.

8 БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность своему научному консультанту члену-корреспонденту РАН д.х.н. Цетлину Виктору Ионовичу, являющемуся руководителем Отдела молекулярной нейроиммунной сигнализации ИБХ РАН, за активную поддержку на всех этапах проведения диссертационной работы, начиная с выбора актуальных тем исследований, поиска путей решения возникающих экспериментальных задач и заканчивая плодотворной дискуссией и критическим рецензированием публикаций.

Мне хочется от всей души поблагодарить коллектив Отдела молекулярной нейроиммунной сигнализации ИБХ РАН за создание теплой дружеской рабочей атмосферы. Хочется отметить профессионализм и постоянное доброжелательное отношение каждого члена нашего коллектива при проведении совместных исследований. Отдельно хотелось бы поблагодарить проф. Уткина Ю.Н., д.х.н. Кашеверова И.Е. и к.х.н. Крюкову Е.В. за ценные практические советы в ходе выполнения диссертационной работы и критическое обсуждение полученных результатов, а также предоставленные нейротоксины из ядов змей и препараты α -конотоксинов моллюсков *Conus*. Также выражаю благодарность д.х.н. Кашеверову И.Е. и к.х.н. Крюковой Е.В. за проведение экспериментов по радиолигандному анализу. Признательна к.х.н. Жмаку М.Н., н.с. Егоровой Н.В., инж.-иссл. Андреевой Т.В. и н.с. Иванову И.А. за предоставленные пептидно-белковые препараты и их производные. Благодарю к.б.н. Кудрявцева Д.С. за помощь в проведении экспериментов по электрофизиологическому анализу с использованием ооцитов *Xenopus* и клеток нейробластомы Neuro2a, а также инж. Сон Л.В. за помощь при проведении экспериментов по сайт-направленному мутагенезу и флуоресцентному анализу. Отдельно хочется отметить практическую помощь моего аспиранта Спириной Е.Н. и студента Гарифулиной А.И. при проведении молекулярных и клеточных работ, а также измерений методом кальциевого имиджинга и методом двухэлектродной фиксации потенциала. Благодарю Карамышеву Н.Д. и Нигматулину Н.Б. за своевременную помощь при возникновении любых административных вопросов.

Искренне благодарю коллег из Института биофизики клетки РАН в г. Пущино к.б.н. Сафронову В.Г., руководителя лаборатории клеточной биологии, а также сотрудников к.б.н. Вульфус Е.А., Мальцеву В.Н., к.б.н. Бережнова А.В., Федотову Е.И., к.ф.-м.н. Гриневича А.А. за проведение хемилюминесцентного анализа продукции активных форм кислорода нейтрофилами, изучение их адгезии и кальциевых ответов.

Выражаю благодарность зарубежным коллегам Лейпцигского университета в Германии профессору Гианнису А. и Малка-Гарсия Г.Р. за предоставление препаратов алкалоидов из яда кураре индейского племени Матис, профессору Романелли М.Н. из Флорентийского университета в Италии за предоставление новых синтетических аналогов хинолина, к.х.н. Дюреку Т. из Института молекулярной биологии Университета Квинсленда в Австралии за предоставление синтетического белка человека SLURP-1, профессору Бржестовскому П.Д. из Нейробиологического института медицины Научного парка Люмини в г. Марселе во Франции за предоставление плазмиды, кодирующей химерный рецептор $\alpha 7$ /ГлиР, а также за практические рекомендации относительно методик пэтч-клампа и кальциевого имиджинга клеток млекопитающих, профессору Холльманну М. и Метфесселю К. из Рурского университета в Германии за предоставление плазмид, кодирующих субъединицы nAChR, а также за помощь в проведении электрофизиологических измерений с использованием этих конструкций, профессору Лукасу Р.Д. из Манчестерского университета в Великобритании за предоставление плазмиды, кодирующей $\alpha 7$ nAChR, проф. Витцеманну В. из Института медицинских исследований им. Макса Планка в Германии за предоставление плазмид, кодирующих субъединицы мышечного nAChR, профессору Ламмис С. из Оксфордского университета в Великобритании за предоставление плазмиды, кодирующей 5-HT_{3A} рецептор, Эрнсту М. из Венского медицинского университета в Австрии за предоставление плазмид, кодирующих субъединицы ГАМК_A-рецептора. Отдельно хочется поблагодарить профессора Гиниатуллина Р.А. из Института молекулярных исследований имени А.И. Виртанена Университета Восточной Финляндии и профессора Куммера В. из Института анатомии и клеточной биологии Университета Ю. Либига г. Гиссена в Германии за возможность проведения в их лабораториях совместных исследований холинергических ноцицептивных механизмов, ценные практические рекомендации, плодотворную дискуссию и помощь при публикации полученных результатов. Также автор признательна сотрудникам лаборатории профессора Гиниатуллина Р.А. Михайлову Н. и Абушику П. за проведение экспериментов по дегрануляции тучных клеток и кальциевого имиджинга нейронов тройничного ганглия, а также к.м.н. Гиниатуллиной Р. за помощь в выделении первичных ганглионарных культур. Хочется также выразить благодарность коллегам из Университета г. Лидса в Великобритании Джон Д. и Хендерсон З. за возможность проведения в их лаборатории совместных исследований роли $\alpha 7$ nAChR в постнатальном нейрогенезе.

Автор признательна академику РАН Стонику В.А. из ТИБОХ ДВО РАН г. Владивостока за предоставление 6-бромогипафорина, академику РАН Никольскому Е.Е. и сотруднику Нуруллину Л. из Казанского Федерального Университета за помощь в гистохимическом окрашивании ацетил- и бутирилхолинэстеразы в препаратах твердой оболочки головного мозга крыс, а также академику РАН Угрюмову М.В. из Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН за предоставленные препараты отделов мозга мышей с моделированием ранних стадий болезни Паркинсона. Благодарю профессора Мурашева А.Н., руководителя Лаборатории биологических испытаний ФИБХ РАН, а также его сотрудников н.с. Лобанова А.Н., м.н.с. Рассказову Е.А., м.н.с. Салмову М.А., н.с. Туховскую Е.А., н.с. Рыкова В.А. и н.с. Слащеву Г.А. за помощь в проведении доклинических исследований безопасности и эффективности лекарственного средства на основе пептида аземиопсина в качестве миорелаксанта, отдельно хочу выразить признательность Музыке И.С., н.с. лаборатории биотехнологии ИБХ РАН, за помощь в подготовке соответствующей отчетной документации.

Благодарю всех членов моей семьи, без неизменной поддержки которых выполнение данной диссертационной работы не могло состояться.

9 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Langley, J.N., *On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari.* J Physiol, 1905. **33**(4-5): p. 374-413.
2. Loewi, O., *On the background of the discovery of neurochemical transmission.* J Mt Sinai Hosp N Y, 1957. **24**(6): p. 1014-6.
3. Dale, H., *Transmission of Nervous Effects by Acetylcholine: Harvey Lecture, May 20, 1937.* Bull N Y Acad Med, 1937. **13**(7): p. 379-96.
4. Fatt, P. and B. Katz, *An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode.* J Physiol, 1951. **115**(3): p. 320-70.
5. Karlin, A. and D. Cowburn, *The affinity-labeling of partially purified acetylcholine receptor from electric tissue of Electrophorus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. **70**(12): p. 3636-40.
6. Noda, M., et al., *Cloning and sequence analysis of calf cDNA and human genomic DNA encoding alpha-subunit precursor of muscle acetylcholine receptor.* Nature, 1983. **305**(5937): p. 818-23.
7. Tanabe, T., et al., *Primary structure of beta subunit precursor of calf muscle acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence.* Eur J Biochem, 1984. **144**(1): p. 11-7.
8. Missias, A.C., et al., *Maturation of the acetylcholine receptor in skeletal muscle: regulation of the AChR gamma-to-epsilon switch.* Dev Biol, 1996. **179**(1): p. 223-38.
9. Heinemann, S., et al., *The nicotinic receptor genes.* Clin Neuropharmacol, 1991. **14 Suppl 1**: p. S45-61.
10. Schoepfer, R., et al., *Brain alpha-bungarotoxin binding protein cDNAs and MAbs reveal subtypes of this branch of the ligand-gated ion channel gene superfamily.* Neuron, 1990. **5**(1): p. 35-48.
11. Couturier, S., et al., *Alpha 5, alpha 3, and non-alpha 3. Three clustered avian genes encoding neuronal nicotinic acetylcholine receptor-related subunits.* J Biol Chem, 1990. **265**(29): p. 17560-7.
12. Boulter, J., et al., *Functional expression of two neuronal nicotinic acetylcholine receptors from cDNA clones identifies a gene family.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(21): p. 7763-7.
13. Deneris, E.S., et al., *Primary structure and expression of beta 2: a novel subunit of neuronal nicotinic acetylcholine receptors.* Neuron, 1988. **1**(1): p. 45-54.
14. Lukas, R.J., et al., *International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits.* Pharmacol Rev, 1999. **51**(2): p. 397-401.
15. Drisdell, R.C. and W.N. Green, *Neuronal alpha-bungarotoxin receptors are alpha7 subunit homomers.* J Neurosci, 2000. **20**(1): p. 133-9.
16. Elgoyhen, A.B., et al., *alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3501-6.
17. Keyser, K.T., et al., *Three subtypes of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors are expressed in chick retina.* J Neurosci, 1993. **13**(2): p. 442-54.
18. Gotti, C. and F. Clementi, *Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology.* Prog Neurobiol, 2004. **74**(6): p. 363-96.
19. Gotti, C., M. Zoli, and F. Clementi, *Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance.* Trends Pharmacol Sci, 2006. **27**(9): p. 482-91.

20. Hucho, F., Weise, C., *Ligand-gated ion channels*. Angew.Chem.Int.Ed., 2001. **40**: p. 3100-3116.
21. Le Novere, N. and J.P. Changeux, *Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells*. J Mol Evol, 1995. **40**(2): p. 155-72.
22. Tsetlin, V., D. Kuzmin, and I. Kasheverov, *Assembly of nicotinic and other Cys-loop receptors*. J Neurochem, 2011. **116**(5): p. 734-41.
23. Wells, G.B., *Structural answers and persistent questions about how nicotinic receptors work*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 5479-510.
24. Tasneem, A., et al., *Identification of the prokaryotic ligand-gated ion channels and their implications for the mechanisms and origins of animal Cys-loop ion channels*. Genome Biol, 2005. **6**(1): p. R4.
25. Bocquet, N., et al., *A prokaryotic proton-gated ion channel from the nicotinic acetylcholine receptor family*. Nature, 2007. **445**(7123): p. 116-9.
26. Unwin, N., *Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4A resolution*. J Mol Biol, 2005. **346**(4): p. 967-89.
27. Brejc, K., et al., *Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 269-76.
28. Corringer, P.J., et al., *Atomic structure and dynamics of pentameric ligand-gated ion channels: new insight from bacterial homologues*. J Physiol, 2010. **588**(Pt 4): p. 565-72.
29. Unwin, N., *Acetylcholine receptor channel imaged in the open state*. Nature, 1995. **373**(6509): p. 37-43.
30. Hucho, F., V.I. Tsetlin, and J. Machold, *The emerging three-dimensional structure of a receptor. The nicotinic acetylcholine receptor*. Eur J Biochem, 1996. **239**(3): p. 539-57.
31. Morales-Perez, C.L., C.M. Noviello, and R.E. Hibbs, *X-ray structure of the human alpha4beta2 nicotinic receptor*. Nature, 2016. **538**(7625): p. 411-415.
32. Wu, Z.S., et al., *Ion channels gated by acetylcholine and serotonin: structures, biology, and drug discovery*. Acta Pharmacol Sin, 2015. **36**(8): p. 895-907.
33. Huang, X., et al., *Crystal structure of human glycine receptor-alpha3 bound to antagonist strychnine*. Nature, 2015. **526**(7572): p. 277-80.
34. Smit, A.B., et al., *A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 261-8.
35. Miyazawa, A., et al., *Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 A resolution: transverse tunnels in the channel wall*. J Mol Biol, 1999. **288**(4): p. 765-86.
36. Hansen, S.B., et al., *Structural and ligand recognition characteristics of an acetylcholine-binding protein from Aplysia californica*. J Biol Chem, 2004. **279**(23): p. 24197-202.
37. Celie, P.H., et al., *Crystal structure of acetylcholine-binding protein from Bulinus truncatus reveals the conserved structural scaffold and sites of variation in nicotinic acetylcholine receptors*. J Biol Chem, 2005. **280**(28): p. 26457-66.
38. Celie, P.H., et al., *Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures*. Neuron, 2004. **41**(6): p. 907-14.
39. Celie, P.H., et al., *Crystal structure of nicotinic acetylcholine receptor homolog AChBP in complex with an alpha-conotoxin PnIA variant*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(7): p. 582-8.
40. Hansen, S.B., et al., *Structures of Aplysia AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations*. EMBO J, 2005. **24**(20): p. 3635-46.
41. Hilf, R.J. and R. Dutzler, *X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel*. Nature, 2008. **452**(7185): p. 375-9.

42. Bocquet, N., et al., *X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation*. Nature, 2009. **457**(7225): p. 111-4.
43. Hilf, R.J. and R. Dutzler, *Structure of a potentially open state of a proton-activated pentameric ligand-gated ion channel*. Nature, 2009. **457**(7225): p. 115-8.
44. Hibbs, R.E. and E. Gouaux, *Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor*. Nature, 2011. **474**(7349): p. 54-60.
45. Hassaine, G., et al., *X-ray structure of the mouse serotonin 5-HT₃ receptor*. Nature, 2014. **512**(7514): p. 276-81.
46. Miller, P.S. and A.R. Aricescu, *Crystal structure of a human GABA_A receptor*. Nature, 2014. **512**(7514): p. 270-5.
47. Corringer, P.J., et al., *Structure and pharmacology of pentameric receptor channels: from bacteria to brain*. Structure, 2012. **20**(6): p. 941-56.
48. Lindstrom, J.M., *Nicotinic acetylcholine receptors of muscles and nerves: comparison of their structures, functional roles, and vulnerability to pathology*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **998**: p. 41-52.
49. Strecker, A., et al., *All potential glycosylation sites of the nicotinic acetylcholine receptor delta subunit from *Torpedo californica* are utilized*. Eur J Biochem, 1994. **220**(3): p. 1005-11.
50. Dellisanti, C.D., et al., *Crystal structure of the extracellular domain of nAChR alpha1 bound to alpha-bungarotoxin at 1.94 Å resolution*. Nat Neurosci, 2007. **10**(8): p. 953-62.
51. daCosta, C.J., D.E. Kaiser, and J.E. Baenziger, *Role of glycosylation and membrane environment in nicotinic acetylcholine receptor stability*. Biophys J, 2005. **88**(3): p. 1755-64.
52. Sauguet, L., et al., *Structural basis for ion permeation mechanism in pentameric ligand-gated ion channels*. EMBO J, 2013. **32**(5): p. 728-41.
53. Ivanov, I., et al., *Barriers to ion translocation in cationic and anionic receptors from the Cys-loop family*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(26): p. 8217-24.
54. Spitzmaul, G., J. Corradi, and C. Bouzat, *Mechanistic contributions of residues in the M1 transmembrane domain of the nicotinic receptor to channel gating*. Mol Membr Biol, 2004. **21**(1): p. 39-50.
55. De Almeida, R.F., et al., *Structure and dynamics of the gammaM4 transmembrane domain of the acetylcholine receptor in lipid bilayers: insights into receptor assembly and function*. Mol Membr Biol, 2006. **23**(4): p. 305-15.
56. Jha, A., et al., *Acetylcholine receptor gating at extracellular transmembrane domain interface: the cys-loop and M2-M3 linker*. J Gen Physiol, 2007. **130**(6): p. 547-58.
57. Lee, W.Y. and S.M. Sine, *Principal pathway coupling agonist binding to channel gating in nicotinic receptors*. Nature, 2005. **438**(7065): p. 243-7.
58. Taly, A., et al., *Allosteric regulation of pentameric ligand-gated ion channels: an emerging mechanistic perspective*. Channels (Austin), 2014. **8**(4): p. 350-60.
59. Eisele, J.L., et al., *Chimaeric nicotinic-serotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities*. Nature, 1993. **366**(6454): p. 479-83.
60. Cooper, S.T., et al., *Up-regulation of cell-surface alpha4beta2 neuronal nicotinic receptors by lower temperature and expression of chimeric subunits*. J Biol Chem, 1999. **274**(38): p. 27145-52.
61. Grutter, T., et al., *Molecular tuning of fast gating in pentameric ligand-gated ion channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(50): p. 18207-12.
62. Duret, G., et al., *Functional prokaryotic-eukaryotic chimera from the pentameric ligand-gated ion channel family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(29): p. 12143-8.
63. Tillman, T.S., et al., *ELIC-alpha7 Nicotinic acetylcholine receptor (alpha7nAChR) chimeras reveal a prominent role of the extracellular-transmembrane domain interface in allosteric modulation*. J Biol Chem, 2014. **289**(20): p. 13851-7.

64. Stokes, C., M. Treinin, and R.L. Papke, *Looking below the surface of nicotinic acetylcholine receptors*. Trends Pharmacol Sci, 2015. **36**(8): p. 514-23.
65. Thompson, A.J., H.A. Lester, and S.C. Lummis, *The structural basis of function in Cys-loop receptors*. Q Rev Biophys, 2010. **43**(4): p. 449-99.
66. Zuber, B. and N. Unwin, *Structure and superorganization of acetylcholine receptor-rapsyn complexes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(26): p. 10622-7.
67. Bouzat, C., N. Bren, and S.M. Sine, *Structural basis of the different gating kinetics of fetal and adult acetylcholine receptors*. Neuron, 1994. **13**(6): p. 1395-402.
68. Mukherjee, J., et al., *Mutations of cytosolic loop residues impair assembly and maturation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors*. J Neurochem, 2009. **110**(6): p. 1885-94.
69. Castelan, F., et al., *Cytoplasmic regions adjacent to the M3 and M4 transmembrane segments influence expression and function of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. A study with single amino acid mutants*. J Neurochem, 2007. **100**(2): p. 406-15.
70. Yu, X.M. and Z.W. Hall, *A sequence in the main cytoplasmic loop of the alpha subunit is required for assembly of mouse muscle nicotinic acetylcholine receptor*. Neuron, 1994. **13**(1): p. 247-55.
71. Kuo, Y.P., et al., *Roles for nicotinic acetylcholine receptor subunit large cytoplasmic loop sequences in receptor expression and function*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **314**(1): p. 455-66.
72. Xu, J., Y. Zhu, and S.F. Heinemann, *Identification of sequence motifs that target neuronal nicotinic receptors to dendrites and axons*. J Neurosci, 2006. **26**(38): p. 9780-93.
73. Pacheco, M.A., T.E. Pastoor, and L. Wecker, *Phosphorylation of the alpha4 subunit of human alpha4beta2 nicotinic receptors: role of cAMP-dependent protein kinase (PKA) and protein kinase C (PKC)*. Brain Res Mol Brain Res, 2003. **114**(1): p. 65-72.
74. Wiesner, A. and C. Fuhrer, *Regulation of nicotinic acetylcholine receptors by tyrosine kinases in the peripheral and central nervous system: same players, different roles*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(23): p. 2818-28.
75. Fenster, C.P., et al., *Regulation of alpha4beta2 nicotinic receptor desensitization by calcium and protein kinase C*. Mol Pharmacol, 1999. **55**(3): p. 432-43.
76. Colledge, M. and S.C. Froehner, *Tyrosine phosphorylation of nicotinic acetylcholine receptor mediates Grb2 binding*. J Neurosci, 1997. **17**(13): p. 5038-45.
77. Cho, C.H., et al., *Rapid upregulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors by tyrosine dephosphorylation*. J Neurosci, 2005. **25**(14): p. 3712-23.
78. Wang, K., et al., *Regulation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor by SRC family tyrosine kinases*. J Biol Chem, 2004. **279**(10): p. 8779-86.
79. Machold, J., et al., *The handedness of the subunit arrangement of the nicotinic acetylcholine receptor from Torpedo californica*. Eur J Biochem, 1995. **234**(2): p. 427-30.
80. Newell, J.G., R.A. McDevitt, and C. Czajkowski, *Mutation of glutamate 155 of the GABAA receptor beta2 subunit produces a spontaneously open channel: a trigger for channel activation*. J Neurosci, 2004. **24**(50): p. 11226-35.
81. Purohit, P., I. Bruhova, and A. Auerbach, *Sources of energy for gating by neurotransmitters in acetylcholine receptor channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(24): p. 9384-9.
82. Tsetlin, V. and F. Hucho, *Nicotinic acetylcholine receptors at atomic resolution*. Curr Opin Pharmacol, 2009. **9**(3): p. 306-10.
83. Hibbs, R.E., et al., *Structural determinants for interaction of partial agonists with acetylcholine binding protein and neuronal alpha7 nicotinic acetylcholine receptor*. EMBO J, 2009. **28**(19): p. 3040-51.

84. Cheng, X., et al., *Targeted molecular dynamics study of C-loop closure and channel gating in nicotinic receptors*. PLoS Comput Biol, 2006. **2**(9): p. e134.
85. Zimmermann, I. and R. Dutzler, *Ligand activation of the prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel ELIC*. PLoS Biol, 2011. **9**(6): p. e1001101.
86. Pan, J., et al., *Structure of the pentameric ligand-gated ion channel ELIC cocrystallized with its competitive antagonist acetylcholine*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 714.
87. Neher, E., *The charge carried by single-channel currents of rat cultured muscle cells in the presence of local anaesthetics*. J Physiol, 1983. **339**: p. 663-78.
88. Changeux, J.P., *The TiPS lecture. The nicotinic acetylcholine receptor: an allosteric protein prototype of ligand-gated ion channels*. Trends Pharmacol Sci, 1990. **11**(12): p. 485-92.
89. Giraudat, J., et al., *Structure of the high-affinity binding site for noncompetitive blockers of the acetylcholine receptor: serine-262 of the delta subunit is labeled by [³H]chlorpromazine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(8): p. 2719-23.
90. Hucho, F., W. Oberthur, and F. Lottspeich, *The ion channel of the nicotinic acetylcholine receptor is formed by the homologous helices M II of the receptor subunits*. FEBS Lett, 1986. **205**(1): p. 137-42.
91. Sauguet, L., A. Shahsavari, and M. Delarue, *Crystallographic studies of pharmacological sites in pentameric ligand-gated ion channels*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1850**(3): p. 511-23.
92. Arias, H.R., P. Bhumireddy, and C. Bouzat, *Molecular mechanisms and binding site locations for noncompetitive antagonists of nicotinic acetylcholine receptors*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(8): p. 1254-76.
93. Curtis, L., et al., *Potentiation of human alpha4beta2 neuronal nicotinic acetylcholine receptor by estradiol*. Mol Pharmacol, 2002. **61**(1): p. 127-35.
94. Nirthanan, S., et al., *Identification of binding sites in the nicotinic acetylcholine receptor for TDBzl-etomidate, a photoreactive positive allosteric effector*. J Biol Chem, 2008. **283**(32): p. 22051-62.
95. Arias, H.R., et al., *Molecular mechanisms and binding site location for the noncompetitive antagonist crystal violet on nicotinic acetylcholine receptors*. Biochemistry, 2006. **45**(7): p. 2014-26.
96. Akk, G. and J.H. Steinbach, *Galantamine activates muscle-type nicotinic acetylcholine receptors without binding to the acetylcholine-binding site*. J Neurosci, 2005. **25**(8): p. 1992-2001.
97. Zhang, L. and W. Xiong, *Modulation of the Cys-loop ligand-gated ion channels by fatty acid and cannabinoids*. Vitam Horm, 2009. **81**: p. 315-35.
98. Hsiao, B., et al., *Determinants of zinc potentiation on the alpha4 subunit of neuronal nicotinic receptors*. Mol Pharmacol, 2006. **69**(1): p. 27-36.
99. Moroni, M., et al., *Non-agonist-binding subunit interfaces confer distinct functional signatures to the alternate stoichiometries of the alpha4beta2 nicotinic receptor: an alpha4-alpha4 interface is required for Zn²⁺ potentiation*. J Neurosci, 2008. **28**(27): p. 6884-94.
100. Nury, H., et al., *X-ray structures of general anaesthetics bound to a pentameric ligand-gated ion channel*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 428-31.
101. Young, G.T., et al., *Potentiation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors via an allosteric transmembrane site*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(38): p. 14686-91.
102. Seo, S., et al., *The positive allosteric modulator morantel binds at noncanonical subunit interfaces of neuronal nicotinic acetylcholine receptors*. J Neurosci, 2009. **29**(27): p. 8734-42.

103. Texido, L., et al., *Effect of galantamine on the human alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor, the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor and spontaneous cholinergic synaptic activity*. Br J Pharmacol, 2005. **145**(5): p. 672-8.
104. Samochocki, M., et al., *Galantamine is an allosterically potentiating ligand of the human alpha4/beta2 nAChR*. Acta Neurol Scand Suppl, 2000. **176**: p. 68-73.
105. Schrattenholz, A., et al., *Agonist responses of neuronal nicotinic acetylcholine receptors are potentiated by a novel class of allosterically acting ligands*. Mol Pharmacol, 1996. **49**(1): p. 1-6.
106. Hansen, S.B. and P. Taylor, *Galanthamine and non-competitive inhibitor binding to ACh-binding protein: evidence for a binding site on non-alpha-subunit interfaces of heteromeric neuronal nicotinic receptors*. J Mol Biol, 2007. **369**(4): p. 895-901.
107. Le Novere, N., T. Grutter, and J.P. Changeux, *Models of the extracellular domain of the nicotinic receptors and of agonist- and Ca²⁺-binding sites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(5): p. 3210-5.
108. Sauguet, L., et al., *Crystal structures of a pentameric ligand-gated ion channel provide a mechanism for activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(3): p. 966-71.
109. Krause, R.M., et al., *Ivermectin: a positive allosteric effector of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor*. Mol Pharmacol, 1998. **53**(2): p. 283-94.
110. Collins, T., G.T. Young, and N.S. Millar, *Competitive binding at a nicotinic receptor transmembrane site of two alpha7-selective positive allosteric modulators with differing effects on agonist-evoked desensitization*. Neuropharmacology, 2011. **61**(8): p. 1306-13.
111. Barron, S.C., et al., *An allosteric modulator of alpha7 nicotinic receptors, N-(5-Chloro-2,4-dimethoxyphenyl)-N'-(5-methyl-3-isoxazolyl)-urea (PNU-120596), causes conformational changes in the extracellular ligand binding domain similar to those caused by acetylcholine*. Mol Pharmacol, 2009. **76**(2): p. 253-63.
112. Forman, S.A., D.C. Chiara, and K.W. Miller, *Anesthetics target interfacial transmembrane sites in nicotinic acetylcholine receptors*. Neuropharmacology, 2015. **96**(Pt B): p. 169-77.
113. Sauguet, L., et al., *Structural basis for potentiation by alcohols and anaesthetics in a ligand-gated ion channel*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 1697.
114. Li, G.D., et al., *Identification of a GABAA receptor anesthetic binding site at subunit interfaces by photolabeling with an etomidate analog*. J Neurosci, 2006. **26**(45): p. 11599-605.
115. Olsen, R.W., et al., *Structural models of ligand-gated ion channels: sites of action for anesthetics and ethanol*. Alcohol Clin Exp Res, 2014. **38**(3): p. 595-603.
116. Heidmann, T., et al., *Reconstitution of a functional acetylcholine receptor. Conservation of the conformational and allosteric transitions and recovery of the permeability response; role of lipids*. Eur J Biochem, 1980. **110**(1): p. 35-55.
117. Sooksawate, T. and M.A. Simmonds, *Effects of membrane cholesterol on the sensitivity of the GABA(A) receptor to GABA in acutely dissociated rat hippocampal neurones*. Neuropharmacology, 2001. **40**(2): p. 178-84.
118. daCosta, C.J. and J.E. Baenziger, *A lipid-dependent uncoupled conformation of the acetylcholine receptor*. J Biol Chem, 2009. **284**(26): p. 17819-25.
119. Baenziger, J.E., et al., *Nicotinic acetylcholine receptor-lipid interactions: Mechanistic insight and biological function*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1848**(9): p. 1806-17.
120. Brannigan, G., et al., *Embedded cholesterol in the nicotinic acetylcholine receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(38): p. 14418-23.
121. Henin, J., et al., *A predicted binding site for cholesterol on the GABAA receptor*. Biophys J, 2014. **106**(9): p. 1938-49.
122. Weng, Y., et al., *Anesthetic sensitivity of the Gloeobacter violaceus proton-gated ion channel*. Anesth Analg, 2010. **110**(1): p. 59-63.

123. Stokes, C., M. Treinin, and R.L. Papke, *Looking below the surface of nicotinic acetylcholine receptors*. Trends Pharmacol Sci, 2015.
124. Changeux, J.P., *The concept of allosteric modulation: an overview*. Drug Discov Today Technol, 2013. **10**(2): p. e223-8.
125. Papke, R.L., *Merging old and new perspectives on nicotinic acetylcholine receptors*. Biochem Pharmacol, 2014. **89**(1): p. 1-11.
126. Mukhtasimova, N., C. Free, and S.M. Sine, *Initial coupling of binding to gating mediated by conserved residues in the muscle nicotinic receptor*. J Gen Physiol, 2005. **126**(1): p. 23-39.
127. Unwin, N. and Y. Fujiyoshi, *Gating movement of acetylcholine receptor caught by plunge-freezing*. J Mol Biol, 2012. **422**(5): p. 617-634.
128. Lummis, S.C., et al., *Cis-trans isomerization at a proline opens the pore of a neurotransmitter-gated ion channel*. Nature, 2005. **438**(7065): p. 248-52.
129. Colquhoun, D. and B. Sakmann, *Fast events in single-channel currents activated by acetylcholine and its analogues at the frog muscle end-plate*. J Physiol, 1985. **369**: p. 501-57.
130. Papke, R.L., *The kinetic properties of neuronal nicotinic receptors: genetic basis of functional diversity*. Prog Neurobiol, 1993. **41**(4): p. 509-31.
131. Williams, D.K., et al., *The effective opening of nicotinic acetylcholine receptors with single agonist binding sites*. J Gen Physiol, 2011. **137**(4): p. 369-84.
132. Land, B.R., et al., *Diffusion and binding constants for acetylcholine derived from the falling phase of miniature endplate currents*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(5): p. 1594-8.
133. Li, P. and J.H. Steinbach, *The neuronal nicotinic alpha4beta2 receptor has a high maximal probability of being open*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(8): p. 1906-15.
134. Papke, R.L., L.P. Dwoskin, and P.A. Crooks, *The pharmacological activity of nicotine and nornicotine on nAChRs subtypes: relevance to nicotine dependence and drug discovery*. J Neurochem, 2007. **101**(1): p. 160-7.
135. Papke, R.L., et al., *Electrophysiological perspectives on the therapeutic use of nicotinic acetylcholine receptor partial agonists*. J Pharmacol Exp Ther, 2011. **337**(2): p. 367-79.
136. Campling, B.G., A. Kuryatov, and J. Lindstrom, *Acute activation, desensitization and smoldering activation of human acetylcholine receptors*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79653.
137. Wonnacott, S., et al., *Presynaptic modulation of transmitter release by nicotinic receptors*. Prog Brain Res, 1989. **79**: p. 157-63.
138. Raftery, M.A., et al., *Acetylcholine receptor: complex of homologous subunits*. Science, 1980. **208**(4451): p. 1454-6.
139. Mishina, M., et al., *Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor*. Nature, 1986. **321**(6068): p. 406-11.
140. Witzemann, V., et al., *Differential regulation of muscle acetylcholine receptor gamma- and epsilon-subunit mRNAs*. FEBS Lett, 1987. **223**(1): p. 104-12.
141. Sine, S.M. and T. Claudio, *Gamma- and delta-subunits regulate the affinity and the cooperativity of ligand binding to the acetylcholine receptor*. J Biol Chem, 1991. **266**(29): p. 19369-77.
142. Ackermann, E.J. and P. Taylor, *Nonidentity of the alpha-neurotoxin binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor revealed by modification in alpha-neurotoxin and receptor structures*. Biochemistry, 1997. **36**(42): p. 12836-44.
143. Sine, S.M., et al., *Mutation of the acetylcholine receptor alpha subunit causes a slow-channel myasthenic syndrome by enhancing agonist binding affinity*. Neuron, 1995. **15**(1): p. 229-39.

144. Unwin, N., et al., *Activation of the nicotinic acetylcholine receptor involves a switch in conformation of the alpha subunits*. J Mol Biol, 2002. **319**(5): p. 1165-76.
145. Wheeler, S.V., et al., *Membrane clustering and bungarotoxin binding by the nicotinic acetylcholine receptor: role of the beta subunit*. J Neurochem, 1994. **63**(5): p. 1891-9.
146. Banks, G.B., et al., *The postsynaptic submembrane machinery at the neuromuscular junction: requirement for rapsyn and the utrophin/dystrophin-associated complex*. J Neurocytol, 2003. **32**(5-8): p. 709-26.
147. Lee, Y., J. Rudell, and M. Ferns, *Rapsyn interacts with the muscle acetylcholine receptor via alpha-helical domains in the alpha, beta, and epsilon subunit intracellular loops*. Neuroscience, 2009. **163**(1): p. 222-32.
148. Borges, L.S., et al., *Identification of a motif in the acetylcholine receptor beta subunit whose phosphorylation regulates rapsyn association and postsynaptic receptor localization*. J Neurosci, 2008. **28**(45): p. 11468-76.
149. Zhang, B., et al., *LRP4 serves as a coreceptor of agrin*. Neuron, 2008. **60**(2): p. 285-97.
150. Kim, N., et al., *Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK*. Cell, 2008. **135**(2): p. 334-42.
151. Glass, D.J., et al., *Agrin acts via a MuSK receptor complex*. Cell, 1996. **85**(4): p. 513-23.
152. Gervasio, O.L., P.F. Armson, and W.D. Phillips, *Developmental increase in the amount of rapsyn per acetylcholine receptor promotes postsynaptic receptor packing and stability*. Dev Biol, 2007. **305**(1): p. 262-75.
153. Friese, M.B., C.S. Blagden, and S.J. Burden, *Synaptic differentiation is defective in mice lacking acetylcholine receptor beta-subunit tyrosine phosphorylation*. Development, 2007. **134**(23): p. 4167-76.
154. Osman, A.A., et al., *Muscle-like nicotinic receptor accessory molecules in sensory hair cells of the inner ear*. Mol Cell Neurosci, 2008. **38**(2): p. 153-69.
155. Green, W.N., A.F. Ross, and T. Claudio, *Acetylcholine receptor assembly is stimulated by phosphorylation of its gamma subunit*. Neuron, 1991. **7**(4): p. 659-66.
156. Ramanathan, V.K. and Z.W. Hall, *Altered glycosylation sites of the delta subunit of the acetylcholine receptor (AChR) reduce alpha delta association and receptor assembly*. J Biol Chem, 1999. **274**(29): p. 20513-20.
157. Gattenlohner, S., et al., *Expression of foetal type acetylcholine receptor is restricted to type 1 muscle fibres in human neuromuscular disorders*. Brain, 2002. **125**(Pt 6): p. 1309-19.
158. Lindstrom, J.M., *Acetylcholine receptors and myasthenia*. Muscle Nerve, 2000. **23**(4): p. 453-77.
159. Conti-Fine, B.M., M. Milani, and H.J. Kaminski, *Myasthenia gravis: past, present, and future*. J Clin Invest, 2006. **116**(11): p. 2843-54.
160. Vincent, A., J. Palace, and D. Hilton-Jones, *Myasthenia gravis*. Lancet, 2001. **357**(9274): p. 2122-8.
161. Lindstrom, J., *Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease*. Mol Neurobiol, 1997. **15**(2): p. 193-222.
162. Poulas, K., et al., *Epidemiology of seropositive myasthenia gravis in Greece*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2001. **71**(3): p. 352-6.
163. Mossman, S., A. Vincent, and J. Newsom-Davis, *Myasthenia gravis without acetylcholine-receptor antibody: a distinct disease entity*. Lancet, 1986. **1**(8473): p. 116-9.
164. Hoch, W., et al., *Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies*. Nat Med, 2001. **7**(3): p. 365-8.
165. Romi, F., et al., *Striational antibodies in myasthenia gravis: reactivity and possible clinical significance*. Arch Neurol, 2005. **62**(3): p. 442-6.

166. Vincent, A., D. Beeson, and B. Lang, *Molecular targets for autoimmune and genetic disorders of neuromuscular transmission*. Eur J Biochem, 2000. **267**(23): p. 6717-28.
167. Tzartos, S.J., et al., *Anatomy of the antigenic structure of a large membrane autoantigen, the muscle-type nicotinic acetylcholine receptor*. Immunol Rev, 1998. **163**: p. 89-120.
168. Beroukhim, R. and N. Unwin, *Three-dimensional location of the main immunogenic region of the acetylcholine receptor*. Neuron, 1995. **15**(2): p. 323-31.
169. Engel, A.G. and S.M. Sine, *Current understanding of congenital myasthenic syndromes*. Curr Opin Pharmacol, 2005. **5**(3): p. 308-21.
170. Hantai, D., et al., *Congenital myasthenic syndromes*. Curr Opin Neurol, 2004. **17**(5): p. 539-51.
171. Ohno, K. and A.G. Engel, *Congenital myasthenic syndromes: gene mutations*. Neuromuscul Disord, 2004. **14**(1): p. 117-22.
172. Engel, A.G., *Congenital myasthenic syndromes*. Neurol Clin, 1994. **12**(2): p. 401-37.
173. Engel, A.G., *Congenital myasthenic syndromes*. J Child Neurol, 1999. **14**(1): p. 38-41.
174. Beeson, D., et al., *126th International Workshop: congenital myasthenic syndromes, 24-26 September 2004, Naarden, the Netherlands*. Neuromuscul Disord, 2005. **15**(7): p. 498-512.
175. Ohno, K., et al., *Rapsyn mutations in humans cause endplate acetylcholine-receptor deficiency and myasthenic syndrome*. Am J Hum Genet, 2002. **70**(4): p. 875-85.
176. Chevessier, F., et al., *MUSK, a new target for mutations causing congenital myasthenic syndrome*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(24): p. 3229-40.
177. Seguela, P., et al., *Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium*. J Neurosci, 1993. **13**(2): p. 596-604.
178. Rubboli, F., et al., *Distribution of nicotinic receptors in the human hippocampus and thalamus*. Eur J Neurosci, 1994. **6**(10): p. 1596-604.
179. Rubboli, F., et al., *Distribution of neuronal nicotinic receptor subunits in human brain*. Neurochem Int, 1994. **25**(1): p. 69-71.
180. Drago, J., et al., *Neuronal nicotinic receptors: insights gained from gene knockout and knockin mutant mice*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(7): p. 1267-80.
181. Dominguez del Toro, E., et al., *Immunocytochemical localization of the alpha 7 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor in the rat central nervous system*. J Comp Neurol, 1994. **349**(3): p. 325-42.
182. Yakel, J.L., *Cholinergic receptors: functional role of nicotinic ACh receptors in brain circuits and disease*. Pflugers Arch, 2013. **465**(4): p. 441-50.
183. Hurst, R., H. Rollema, and D. Bertrand, *Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics*. Pharmacol Ther, 2013. **137**(1): p. 22-54.
184. Jones, S., S. Sudweeks, and J.L. Yakel, *Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function*. Trends Neurosci, 1999. **22**(12): p. 555-61.
185. Jones, S. and J.L. Yakel, *Functional nicotinic ACh receptors on interneurons in the rat hippocampus*. J Physiol, 1997. **504** (Pt 3): p. 603-10.
186. Sudweeks, S.N. and J.L. Yakel, *Functional and molecular characterization of neuronal nicotinic ACh receptors in rat CA1 hippocampal neurons*. J Physiol, 2000. **527** Pt 3: p. 515-28.
187. Colombo, S.F., et al., *Biogenesis, trafficking and up-regulation of nicotinic ACh receptors*. Biochem Pharmacol, 2013. **86**(8): p. 1063-73.
188. Khiroug, S.S., et al., *Rat nicotinic ACh receptor alpha7 and beta2 subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels*. J Physiol, 2002. **540**(Pt 2): p. 425-34.
189. Quick, M.W., et al., *Alpha3beta4 subunit-containing nicotinic receptors dominate function in rat medial habenula neurons*. Neuropharmacology, 1999. **38**(6): p. 769-83.

190. Willmann, R. and C. Fuhrer, *Neuromuscular synaptogenesis: clustering of acetylcholine receptors revisited*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(8): p. 1296-316.
191. Grinevich, V.P., et al., *Heterologous expression of human $\{\alpha\}6\{\beta\}4\{\beta\}3\{\alpha\}5$ nicotinic acetylcholine receptors: binding properties consistent with their natural expression require quaternary subunit assembly including the $\{\alpha\}5$ subunit*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **312**(2): p. 619-26.
192. Ramirez-Latorre, J., et al., *Functional contributions of alpha5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels*. Nature, 1996. **380**(6572): p. 347-51.
193. Millar, N.S. and C. Gotti, *Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors*. Neuropharmacology, 2009. **56**(1): p. 237-46.
194. Adams, D.J. and T.J. Nutter, *Calcium permeability and modulation of nicotinic acetylcholine receptor-channels in rat parasympathetic neurons*. J Physiol Paris, 1992. **86**(1-3): p. 67-76.
195. Castro, N.G. and E.X. Albuquerque, *alpha-Bungarotoxin-sensitive hippocampal nicotinic receptor channel has a high calcium permeability*. Biophys J, 1995. **68**(2): p. 516-24.
196. Rathouz, M.M. and D.K. Berg, *Synaptic-type acetylcholine receptors raise intracellular calcium levels in neurons by two mechanisms*. J Neurosci, 1994. **14**(11 Pt 2): p. 6935-45.
197. Dajas-Bailador, F.A., A.J. Mogg, and S. Wonnacott, *Intracellular Ca²⁺ signals evoked by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells: contribution of voltage-operated Ca²⁺ channels and Ca²⁺ stores*. J Neurochem, 2002. **81**(3): p. 606-14.
198. Brain, K.L., et al., *Nicotine induces calcium spikes in single nerve terminal varicosities: a role for intracellular calcium stores*. Neuroscience, 2001. **106**(2): p. 395-403.
199. Shoop, R.D., et al., *Synaptically driven calcium transients via nicotinic receptors on somatic spines*. J Neurosci, 2001. **21**(3): p. 771-81.
200. Beker, F., et al., *Muscarinic and nicotinic ACh receptor activation differentially mobilize Ca²⁺ in rat intracardiac ganglion neurons*. J Neurophysiol, 2003. **90**(3): p. 1956-64.
201. Barrantes, G.E., et al., *Nicotine increases intracellular calcium in rat hippocampal neurons via voltage-gated calcium channels*. Neurosci Lett, 1995. **196**(1-2): p. 101-4.
202. Tsuneki, H., et al., *Calcium mobilization elicited by two types of nicotinic acetylcholine receptors in mouse substantia nigra pars compacta*. Eur J Neurosci, 2000. **12**(7): p. 2475-85.
203. Sharma, G. and S. Vijayaraghavan, *Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular stores*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(7): p. 4148-53.
204. Millar, N.S. and P.C. Harkness, *Assembly and trafficking of nicotinic acetylcholine receptors (Review)*. Mol Membr Biol, 2008. **25**(4): p. 279-92.
205. Wang, H., et al., *Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation*. Nature, 2003. **421**(6921): p. 384-8.
206. Wessler, I. and C.J. Kirkpatrick, *Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans*. Br J Pharmacol, 2008. **154**(8): p. 1558-71.
207. Shen, J.X. and J.L. Yakel, *Functional alpha7 nicotinic ACh receptors on astrocytes in rat hippocampal CA1 slices*. J Mol Neurosci, 2012. **48**(1): p. 14-21.
208. Shytle, R.D., et al., *Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors*. J Neurochem, 2004. **89**(2): p. 337-43.
209. Si, M.L. and T.J. Lee, *Alpha7-nicotinic acetylcholine receptors on cerebral perivascular sympathetic nerves mediate choline-induced nitrergic neurogenic vasodilation*. Circ Res, 2002. **91**(1): p. 62-9.
210. Levin, E.D., *alpha7-Nicotinic receptors and cognition*. Curr Drug Targets, 2012. **13**(5): p. 602-6.
211. Velez-Fort, M., E. Audinat, and M.C. Angulo, *Functional alpha 7-containing nicotinic receptors of NG2-expressing cells in the hippocampus*. Glia, 2009. **57**(10): p. 1104-14.

212. De Simone, R., et al., *Activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor by nicotine selectively up-regulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in rat microglial cultures.* J Neuroinflammation, 2005. **2**(1): p. 4.
213. Suzuki, T., et al., *Microglial alpha7 nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase C/IP3 pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role.* J Neurosci Res, 2006. **83**(8): p. 1461-70.
214. Hawkins, B.T., R.D. Egleton, and T.P. Davis, *Modulation of cerebral microvascular permeability by endothelial nicotinic acetylcholine receptors.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(1): p. H212-9.
215. Hernandez, C.M. and K.T. Dineley, *alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease: neuroprotective, neurotrophic or both?* Curr Drug Targets, 2012. **13**(5): p. 613-22.
216. Shen, J.X. and J.L. Yakel, *Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system.* Acta Pharmacol Sin, 2009. **30**(6): p. 673-80.
217. Gahring, L.C., et al., *Nicotinic receptor alpha7 expression identifies a novel hematopoietic progenitor lineage.* PLoS One, 2013. **8**(3): p. e57481.
218. Olofsson, P.S., et al., *Rethinking inflammation: neural circuits in the regulation of immunity.* Immunol Rev, 2012. **248**(1): p. 188-204.
219. Yu, C.R. and L.W. Role, *Functional contribution of the alpha7 subunit to multiple subtypes of nicotinic receptors in embryonic chick sympathetic neurones.* J Physiol, 1998. **509 (Pt 3)**: p. 651-65.
220. Girod, R., et al., *Heteromeric complexes of alpha 5 and/or alpha 7 subunits. Effects of calcium and potential role in nicotine-induced presynaptic facilitation.* Ann N Y Acad Sci, 1999. **868**: p. 578-90.
221. Shao, Z. and J.L. Yakel, *Single channel properties of neuronal nicotinic ACh receptors in stratum radiatum interneurons of rat hippocampal slices.* J Physiol, 2000. **527 Pt 3**: p. 507-13.
222. Palma, E., et al., *Nicotinic acetylcholine receptors assembled from the alpha7 and beta3 subunits.* J Biol Chem, 1999. **274**(26): p. 18335-40.
223. Murray, T.A., et al., *alpha7beta2 nicotinic acetylcholine receptors assemble, function, and are activated primarily via their alpha7-alpha7 interfaces.* Mol Pharmacol, 2012. **81**(2): p. 175-88.
224. Liu, Q., et al., *A novel nicotinic acetylcholine receptor subtype in basal forebrain cholinergic neurons with high sensitivity to amyloid peptides.* J Neurosci, 2009. **29**(4): p. 918-29.
225. Iturriaga-Vasquez, P., et al., *Multiple binding sites in the nicotinic acetylcholine receptors: An opportunity for polypharmacology.* Pharmacol Res, 2015. **101**: p. 9-17.
226. Wonnacott, S., *Presynaptic nicotinic ACh receptors.* Trends Neurosci, 1997. **20**(2): p. 92-8.
227. Alkondon, M., E.F. Pereira, and E.X. Albuquerque, *alpha-bungarotoxin- and methyllycaconitine-sensitive nicotinic receptors mediate fast synaptic transmission in interneurons of rat hippocampal slices.* Brain Res, 1998. **810**(1-2): p. 257-63.
228. Frazier, C.J., et al., *Synaptic potentials mediated via alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal interneurons.* J Neurosci, 1998. **18**(20): p. 8228-35.
229. Bell, K.A., et al., *Nicotinic excitatory postsynaptic potentials in hippocampal CA1 interneurons are predominantly mediated by nicotinic receptors that contain alpha4 and beta2 subunits.* Neuropharmacology, 2011. **61**(8): p. 1379-88.
230. Gu, Z. and J.L. Yakel, *Timing-dependent septal cholinergic induction of dynamic hippocampal synaptic plasticity.* Neuron, 2011. **71**(1): p. 155-65.

231. Roerig, B., D.A. Nelson, and L.C. Katz, *Fast synaptic signaling by nicotinic acetylcholine and serotonin 5-HT₃ receptors in developing visual cortex*. J Neurosci, 1997. **17**(21): p. 8353-62.
232. Sun, Y.G., et al., *Biphasic cholinergic synaptic transmission controls action potential activity in thalamic reticular nucleus neurons*. J Neurosci, 2013. **33**(5): p. 2048-59.
233. Hatton, G.I. and Q.Z. Yang, *Synaptic potentials mediated by alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors in supraoptic nucleus*. J Neurosci, 2002. **22**(1): p. 29-37.
234. Bennett, C., et al., *Mechanisms generating dual-component nicotinic EPSCs in cortical interneurons*. J Neurosci, 2012. **32**(48): p. 17287-96.
235. Lendvai, B. and E.S. Vizi, *Nonsynaptic chemical transmission through nicotinic acetylcholine receptors*. Physiol Rev, 2008. **88**(2): p. 333-49.
236. Albuquerque, E.X., et al., *Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function*. Physiol Rev, 2009. **89**(1): p. 73-120.
237. Auld, D.S., et al., *Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies*. Prog Neurobiol, 2002. **68**(3): p. 209-45.
238. Mesulam, M.M., *Cholinergic circuitry of the human nucleus basalis and its fate in Alzheimer's disease*. J Comp Neurol, 2013. **521**(18): p. 4124-44.
239. Mufson, E.J., et al., *Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: therapeutic implications*. Expert Rev Neurother, 2008. **8**(11): p. 1703-18.
240. Parri, H.R., C.M. Hernandez, and K.T. Dineley, *Research update: Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor mechanisms in Alzheimer's disease*. Biochem Pharmacol, 2011. **82**(8): p. 931-42.
241. Dineley, K.T., *Beta-amyloid peptide--nicotinic acetylcholine receptor interaction: the two faces of health and disease*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 5030-8.
242. Wang, H.Y., et al., *Amyloid peptide Abeta(1-42) binds selectively and with picomolar affinity to alpha7 nicotinic acetylcholine receptors*. J Neurochem, 2000. **75**(3): p. 1155-61.
243. Puzzo, D., et al., *Endogenous amyloid-beta is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory*. Ann Neurol, 2011. **69**(5): p. 819-30.
244. Pirttimaki, T.M., et al., *alpha7 Nicotinic receptor-mediated astrocytic gliotransmitter release: Abeta effects in a preclinical Alzheimer's mouse model*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e81828.
245. Dineley, K.T., et al., *Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: In vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease*. J Neurosci, 2001. **21**(12): p. 4125-33.
246. Talantova, M., et al., *Abeta induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(27): p. E2518-27.
247. Moretti, M., et al., *The novel alpha7beta2-nicotinic acetylcholine receptor subtype is expressed in mouse and human basal forebrain: biochemical and pharmacological characterization*. Mol Pharmacol, 2014. **86**(3): p. 306-17.
248. Liu, Q., H. Kawai, and D.K. Berg, *beta -Amyloid peptide blocks the response of alpha 7-containing nicotinic receptors on hippocampal neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(8): p. 4734-9.
249. Pettit, D.L., Z. Shao, and J.L. Yakel, *beta-Amyloid(1-42) peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice*. J Neurosci, 2001. **21**(1): p. RC120.
250. Colon-Saez, J.O. and J.L. Yakel, *The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor function in hippocampal neurons is regulated by the lipid composition of the plasma membrane*. J Physiol, 2011. **589**(Pt 13): p. 3163-74.

251. Lamb, P.W., M.A. Melton, and J.L. Yakel, *Inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels expressed in Xenopus oocytes by beta-amyloid1-42 peptide*. J Mol Neurosci, 2005. **27**(1): p. 13-21.
252. Chin, J.H., et al., *Amyloid beta protein modulates glutamate-mediated neurotransmission in the rat basal forebrain: involvement of presynaptic neuronal nicotinic acetylcholine and metabotropic glutamate receptors*. J Neurosci, 2007. **27**(35): p. 9262-9.
253. Dougherty, J.J., J. Wu, and R.A. Nichols, *Beta-amyloid regulation of presynaptic nicotinic receptors in rat hippocampus and neocortex*. J Neurosci, 2003. **23**(17): p. 6740-7.
254. Court, J., et al., *Nicotinic receptor abnormalities in Alzheimer's disease*. Biol Psychiatry, 2001. **49**(3): p. 175-84.
255. Aubert, I., et al., *Comparative alterations of nicotinic and muscarinic binding sites in Alzheimer's and Parkinson's diseases*. J Neurochem, 1992. **58**(2): p. 529-41.
256. Davies, P. and S. Feisullin, *Postmortem stability of alpha-bungarotoxin binding sites in mouse and human brain*. Brain Res, 1981. **216**(2): p. 449-54.
257. Sugaya, K., E. Giacobini, and V.A. Chiappinelli, *Nicotinic acetylcholine receptor subtypes in human frontal cortex: changes in Alzheimer's disease*. J Neurosci Res, 1990. **27**(3): p. 349-59.
258. Hyman, B.T., et al., *National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease*. Alzheimers Dement, 2012. **8**(1): p. 1-13.
259. Davis, K.L., et al., *Cholinergic markers in elderly patients with early signs of Alzheimer disease*. JAMA, 1999. **281**(15): p. 1401-6.
260. DeKosky, S.T., et al., *Upregulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment*. Ann Neurol, 2002. **51**(2): p. 145-55.
261. Counts, S.E., et al., *Alpha7 nicotinic receptor up-regulation in cholinergic basal forebrain neurons in Alzheimer disease*. Arch Neurol, 2007. **64**(12): p. 1771-6.
262. Albert, M.S., et al., *The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease*. Alzheimers Dement, 2011. **7**(3): p. 270-9.
263. McKhann, G.M., et al., *The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease*. Alzheimers Dement, 2011. **7**(3): p. 263-9.
264. Fu, W. and J.H. Jhamandas, *Beta-amyloid peptide activates non-alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in rat basal forebrain neurons*. J Neurophysiol, 2003. **90**(5): p. 3130-6.
265. Dineley, K.T., et al., *beta -Amyloid peptide activates alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors expressed in Xenopus oocytes*. J Biol Chem, 2002. **277**(28): p. 25056-61.
266. Puzzo, D., et al., *Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus*. J Neurosci, 2008. **28**(53): p. 14537-45.
267. Bell, K.A., et al., *MAPK recruitment by beta-amyloid in organotypic hippocampal slice cultures depends on physical state and exposure time*. J Neurochem, 2004. **91**(2): p. 349-61.
268. Puzzo, D. and O. Arancio, *Amyloid-beta peptide: Dr. Jekyll or Mr. Hyde?* J Alzheimers Dis, 2013. **33 Suppl 1**: p. S111-20.
269. Teaktong, T., et al., *Alzheimer's disease is associated with a selective increase in alpha7 nicotinic acetylcholine receptor immunoreactivity in astrocytes*. Glia, 2003. **41**(2): p. 207-11.

270. Wang, H.Y., et al., *Dissociating beta-amyloid from alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor by a novel therapeutic agent, S 24795, normalizes alpha 7 nicotinic acetylcholine and NMDA receptor function in Alzheimer's disease brain*. J Neurosci, 2009. **29**(35): p. 10961-73.
271. Chu, L.W., et al., *Increased alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor protein levels in Alzheimer's disease patients*. Dement Geriatr Cogn Disord, 2005. **19**(2-3): p. 106-12.
272. Yu, W.F., et al., *High selective expression of alpha7 nicotinic receptors on astrocytes in the brains of patients with sporadic Alzheimer's disease and patients carrying Swedish APP 670/671 mutation: a possible association with neuritic plaques*. Exp Neurol, 2005. **192**(1): p. 215-25.
273. Dineley, K.T., et al., *Accelerated plaque accumulation, associative learning deficits, and up-regulation of alpha 7 nicotinic receptor protein in transgenic mice co-expressing mutant human presenilin 1 and amyloid precursor proteins*. J Biol Chem, 2002. **277**(25): p. 22768-80.
274. Liu, Q., et al., *A novel nicotinic mechanism underlies beta-amyloid-induced neuronal hyperexcitation*. J Neurosci, 2013. **33**(17): p. 7253-63.
275. Wang, H.Y., et al., *S 24795 limits beta-amyloid-alpha7 nicotinic receptor interaction and reduces Alzheimer's disease-like pathologies*. Biol Psychiatry, 2010. **67**(6): p. 522-30.
276. Maelicke, A., et al., *Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease*. Biol Psychiatry, 2001. **49**(3): p. 279-88.
277. Barnes, C.A., et al., *Chronic treatment of old rats with donepezil or galantamine: effects on memory, hippocampal plasticity and nicotinic receptors*. Neuroscience, 2000. **99**(1): p. 17-23.
278. Bertrand, D. and A.V. Terry, Jr., *The wonderland of neuronal nicotinic acetylcholine receptors*. Biochem Pharmacol, 2018. **151**: p. 214-225.
279. Schaaf, C.P., *Nicotinic acetylcholine receptors in human genetic disease*. Genet Med, 2014. **16**(9): p. 649-56.
280. Young, J.W. and M.A. Geyer, *Evaluating the role of the alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor in the pathophysiology and treatment of schizophrenia*. Biochem Pharmacol, 2013. **86**(8): p. 1122-32.
281. Leonard, S., S. Mexal, and R. Freedman, *Smoking, Genetics and Schizophrenia: Evidence for Self Medication*. J Dual Diagn, 2007. **3**(3-4): p. 43-59.
282. Hong, L.E., et al., *Effects of moderate-dose treatment with varenicline on neurobiological and cognitive biomarkers in smokers and nonsmokers with schizophrenia or schizoaffective disorder*. Arch Gen Psychiatry, 2011. **68**(12): p. 1195-206.
283. Wing, V.C., et al., *Varenicline modulates spatial working memory deficits in smokers with schizophrenia*. Schizophr Res, 2013. **149**(1-3): p. 190-1.
284. Shim, J.C., et al., *Adjunctive varenicline treatment with antipsychotic medications for cognitive impairments in people with schizophrenia: a randomized double-blind placebo-controlled trial*. Neuropsychopharmacology, 2012. **37**(3): p. 660-8.
285. Mihalak, K.B., F.I. Carroll, and C.W. Luetje, *Varenicline is a partial agonist at alpha4beta2 and a full agonist at alpha7 neuronal nicotinic receptors*. Mol Pharmacol, 2006. **70**(3): p. 801-5.
286. Hurst, R.S., et al., *A novel positive allosteric modulator of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor: in vitro and in vivo characterization*. J Neurosci, 2005. **25**(17): p. 4396-405.
287. Dunlop, J., et al., *Old and new pharmacology: positive allosteric modulation of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor by the 5-hydroxytryptamine(2B/C) receptor antagonist SB-206553 (3,5-dihydro-5-methyl-N-3-pyridinylbenzo[1,2-b:4,5-b']di pyrrole-1(2H)-carboxamide)*. J Pharmacol Exp Ther, 2009. **328**(3): p. 766-76.

288. Dinklo, T., et al., *Characterization of 2-[[4-fluoro-3-(trifluoromethyl)phenyl]amino]-4-(4-pyridinyl)-5-thiazolemethanol (JNJ-1930942), a novel positive allosteric modulator of the α_7 nicotinic acetylcholine receptor*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011. **336**(2): p. 560-74.
289. Olincy, A., et al., *Proof-of-concept trial of an α_7 nicotinic agonist in schizophrenia*. *Arch Gen Psychiatry*, 2006. **63**(6): p. 630-8.
290. Tregellas, J.R., et al., *Effects of an α_7 -nicotinic agonist on default network activity in schizophrenia*. *Biol Psychiatry*, 2011. **69**(1): p. 7-11.
291. Preskorn, S.H., et al., *Normalizing effects of EVP-6124, an α_7 nicotinic partial agonist, on event-related potentials and cognition: a proof of concept, randomized trial in patients with schizophrenia*. *J Psychiatr Pract*, 2014. **20**(1): p. 12-24.
292. State, M.W. and P. Levitt, *The conundrums of understanding genetic risks for autism spectrum disorders*. *Nat Neurosci*, 2011. **14**(12): p. 1499-506.
293. Ebert, D.H. and M.E. Greenberg, *Activity-dependent neuronal signalling and autism spectrum disorder*. *Nature*, 2013. **493**(7432): p. 327-37.
294. Resende, R.R. and A. Adhikari, *Cholinergic receptor pathways involved in apoptosis, cell proliferation and neuronal differentiation*. *Cell Commun Signal*, 2009. **7**: p. 20.
295. Narla, S., et al., *α_7 nicotinic receptor agonist reactivates neurogenesis in adult brain*. *Biochem Pharmacol*, 2013. **86**(8): p. 1099-104.
296. Perry, E.K., et al., *Cholinergic activity in autism: abnormalities in the cerebral cortex and basal forebrain*. *Am J Psychiatry*, 2001. **158**(7): p. 1058-66.
297. Martin-Ruiz, C.M., et al., *Molecular analysis of nicotinic receptor expression in autism*. *Brain Res Mol Brain Res*, 2004. **123**(1-2): p. 81-90.
298. Deutsch, S.I., et al., *Cholinergic abnormalities in autism: is there a rationale for selective nicotinic agonist interventions?* *Clin Neuropharmacol*, 2010. **33**(3): p. 114-20.
299. Pandya, A. and J.L. Yakel, *Allosteric modulators of the $\alpha_4\beta_2$ subtype of neuronal nicotinic acetylcholine receptors*. *Biochem Pharmacol*, 2011. **82**(8): p. 952-8.
300. Lopez, M.G., et al., *Can cholinesterase inhibitors provide additional effects to cholinergic neurotransmission enhancement?* *J Mol Neurosci*, 2006. **30**(1-2): p. 141-4.
301. Srivastava, R.K., M. Agarwal, and A. Pundhir, *Role of donepezil in autism: its conduciveness in psychopharmacotherapy*. *Case Rep Psychiatry*, 2011. **2011**: p. 563204.
302. Ghaleiha, A., et al., *Galantamine efficacy and tolerability as an augmentative therapy in autistic children: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. *J Psychopharmacol*, 2014. **28**(7): p. 677-85.
303. Backonja, M.M., *Defining neuropathic pain*. *Anesth Analg*, 2003. **97**(3): p. 785-90.
304. Woolf, C.J. and R.J. Mannion, *Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management*. *Lancet*, 1999. **353**(9168): p. 1959-64.
305. Grichnik, K.P. and F.M. Ferrante, *The difference between acute and chronic pain*. *Mt Sinai J Med*, 1991. **58**(3): p. 217-20.
306. Umana, I.C., C.A. Daniele, and D.S. McGehee, *Neuronal nicotinic receptors as analgesic targets: it's a winding road*. *Biochem Pharmacol*, 2013. **86**(8): p. 1208-14.
307. Hamann, S.R. and W.R. Martin, *Opioid and nicotinic analgesic and hyperalgesic loci in the rat brain stem*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1992. **261**(2): p. 707-15.
308. Sahley, T.L. and G.G. Berntson, *Antinociceptive effects of central and systemic administrations of nicotine in the rat*. *Psychopharmacology (Berl)*, 1979. **65**(3): p. 279-83.
309. Sullivan, J.P., et al., *(+/-)-Epibatidine elicits a diversity of in vitro and in vivo effects mediated by nicotinic acetylcholine receptors*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994. **271**(2): p. 624-31.
310. Daly, J.W., et al., *Alkaloids from frog skin: the discovery of epibatidine and the potential for developing novel non-opioid analgesics*. *Nat Prod Rep*, 2000. **17**(2): p. 131-5.

311. Bannon, A.W., et al., *Broad-spectrum, non-opioid analgesic activity by selective modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors*. *Science*, 1998. **279**(5347): p. 77-81.
312. Gerzanich, V., et al., *Comparative pharmacology of epibatidine: a potent agonist for neuronal nicotinic acetylcholine receptors*. *Mol Pharmacol*, 1995. **48**(4): p. 774-82.
313. Kesingland, A.C., et al., *Analgesic profile of the nicotinic acetylcholine receptor agonists, (+)-epibatidine and ABT-594 in models of persistent inflammatory and neuropathic pain*. *Pain*, 2000. **86**(1-2): p. 113-8.
314. Rowbotham, M.C., et al., *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): p. 245-52.
315. Gao, B., et al., *Pharmacological effects of nonselective and subtype-selective nicotinic acetylcholine receptor agonists in animal models of persistent pain*. *Pain*, 2010. **149**(1): p. 33-49.
316. Nirogi, R., et al., *Antinociceptive activity of alpha4beta2* neuronal nicotinic receptor agonist A-366833 in experimental models of neuropathic and inflammatory pain*. *Eur J Pharmacol*, 2011. **668**(1-2): p. 155-62.
317. Genzen, J.R. and D.S. McGehee, *Nicotinic modulation of GABAergic synaptic transmission in the spinal cord dorsal horn*. *Brain Res*, 2005. **1031**(2): p. 229-37.
318. Yalcin, I., et al., *Nociceptive thresholds are controlled through spinal beta2-subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors*. *Pain*, 2011. **152**(9): p. 2131-7.
319. Wang, Y., et al., *Antinociceptive effects of choline against acute and inflammatory pain*. *Neuroscience*, 2005. **132**(1): p. 49-56.
320. Pandya, A.A. and J.L. Yakel, *Effects of neuronal nicotinic acetylcholine receptor allosteric modulators in animal behavior studies*. *Biochem Pharmacol*, 2013. **86**(8): p. 1054-62.
321. Munro, G., et al., *The alpha7 nicotinic ACh receptor agonist compound B and positive allosteric modulator PNU-120596 both alleviate inflammatory hyperalgesia and cytokine release in the rat*. *Br J Pharmacol*, 2012. **167**(2): p. 421-35.
322. Freitas, K., et al., *In vivo pharmacological interactions between a type II positive allosteric modulator of alpha7 nicotinic ACh receptors and nicotinic agonists in a murine tonic pain model*. *Br J Pharmacol*, 2013. **169**(3): p. 567-79.
323. Freitas, K., et al., *Effects of alpha7 positive allosteric modulators in murine inflammatory and chronic neuropathic pain models*. *Neuropharmacology*, 2013. **65**: p. 156-64.
324. Lee, C.H., et al., *alpha4beta2 neuronal nicotinic receptor positive allosteric modulation: an approach for improving the therapeutic index of alpha4beta2 nAChR agonists in pain*. *Biochem Pharmacol*, 2011. **82**(8): p. 959-66.
325. Rode, F., et al., *Positive allosteric modulation of alpha4beta2 nAChR agonist induced behaviour*. *Brain Res*, 2012. **1458**: p. 67-75.
326. Jackson, K.J., et al., *Role of alpha5 nicotinic acetylcholine receptors in pharmacological and behavioral effects of nicotine in mice*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010. **334**(1): p. 137-46.
327. Lips, K.S., U. Pfeil, and W. Kummer, *Coexpression of alpha 9 and alpha 10 nicotinic acetylcholine receptors in rat dorsal root ganglion neurons*. *Neuroscience*, 2002. **115**(1): p. 1-5.
328. Hone, A.J. and J.M. McIntosh, *Nicotinic acetylcholine receptors in neuropathic and inflammatory pain*. *FEBS Lett*, 2018. **592**(7): p. 1045-1062.
329. Dale, H.H. and H.W. Dudley, *The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of the ox and the horse*. *J Physiol*, 1929. **68**(2): p. 97-123.

330. Fujii, T., et al., *Induction of choline acetyltransferase mRNA in human mononuclear leukocytes stimulated by phytohemagglutinin, a T-cell activator*. J Neuroimmunol, 1998. **82**(1): p. 101-7.
331. Rodriguez-Diaz, R., et al., *Alpha cells secrete acetylcholine as a non-neuronal paracrine signal priming beta cell function in humans*. Nat Med, 2011. **17**(7): p. 888-92.
332. Grando, S.A., et al., *Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine*. J Invest Dermatol, 1993. **101**(1): p. 32-6.
333. Takahashi, T., et al., *Non-neuronal acetylcholine as an endogenous regulator of proliferation and differentiation of Lgr5-positive stem cells in mice*. FEBS J, 2014. **281**(20): p. 4672-90.
334. Elgoyhen, A.B., et al., *Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells*. Cell, 1994. **79**(4): p. 705-15.
335. Nguyen, V.T., A. Ndoye, and S.A. Grando, *Novel human alpha9 acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is targeted by Pemphigus vulgaris autoimmunity*. Am J Pathol, 2000. **157**(4): p. 1377-91.
336. Criado, M., *Acetylcholine nicotinic receptor subtypes in chromaffin cells*. Pflugers Arch, 2018. **470**(1): p. 13-20.
337. Fujii, T., Y. Takada-Takatori, and K. Kawashima, *Regulatory mechanisms of acetylcholine synthesis and release by T cells*. Life Sci, 2012. **91**(21-22): p. 981-5.
338. Fujii, T., Y. Takada-Takatori, and K. Kawashima, *Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: expression of an independent, non-neuronal cholinergic system in lymphocytes and its clinical significance in immunotherapy*. J Pharmacol Sci, 2008. **106**(2): p. 186-92.
339. Borovikova, L.V., et al., *Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin*. Nature, 2000. **405**(6785): p. 458-62.
340. Tracey, K.J., *The inflammatory reflex*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 853-9.
341. Huston, J.M., et al., *Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1623-8.
342. Rosas-Ballina, M., et al., *Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit*. Science, 2011. **334**(6052): p. 98-101.
343. Rosas-Ballina, M., et al., *Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(31): p. 11008-13.
344. Reardon, C., et al., *Lymphocyte-derived ACh regulates local innate but not adaptive immunity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(4): p. 1410-5.
345. Goverse, G., M. Stakenborg, and G. Matteoli, *The intestinal cholinergic anti-inflammatory pathway*. J Physiol, 2016. **594**(20): p. 5771-5780.
346. Tsuchida, Y., et al., *Neuronal stimulation with 5-hydroxytryptamine 4 receptor induces anti-inflammatory actions via alpha7nACh receptors on muscularis macrophages associated with postoperative ileus*. Gut, 2011. **60**(5): p. 638-47.
347. Matteoli, G. and G.E. Boeckxstaens, *The vagal innervation of the gut and immune homeostasis*. Gut, 2013. **62**(8): p. 1214-22.
348. Parada, E., et al., *The microglial alpha7-acetylcholine nicotinic receptor is a key element in promoting neuroprotection by inducing heme oxygenase-1 via nuclear factor erythroid-2-related factor 2*. Antioxid Redox Signal, 2013. **19**(11): p. 1135-48.
349. Revathikumar, P., et al., *Immunomodulatory effects of nicotine on interleukin 1beta activated human astrocytes and the role of cyclooxygenase 2 in the underlying mechanism*. J Neuroinflammation, 2016. **13**(1): p. 256.
350. Matteoli, G., et al., *A distinct vagal anti-inflammatory pathway modulates intestinal muscularis resident macrophages independent of the spleen*. Gut, 2014. **63**(6): p. 938-48.

351. St-Pierre, S., et al., *Nicotinic Acetylcholine Receptors Modulate Bone Marrow-Derived Pro-Inflammatory Monocyte Production and Survival*. PLoS One, 2016. **11**(2): p. e0150230.
352. Jiang, W., et al., *Infiltration of CCR2+Ly6Chigh Proinflammatory Monocytes and Neutrophils into the Central Nervous System Is Modulated by Nicotinic Acetylcholine Receptors in a Model of Multiple Sclerosis*. J Immunol, 2016. **196**(5): p. 2095-108.
353. Koval, L., et al., *Differential involvement of alpha4beta2, alpha7 and alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptors in B lymphocyte activation in vitro*. Int J Biochem Cell Biol, 2011. **43**(4): p. 516-24.
354. Davalos, D., et al., *ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo*. Nat Neurosci, 2005. **8**(6): p. 752-8.
355. Farina, C., F. Aloisi, and E. Meinl, *Astrocytes are active players in cerebral innate immunity*. Trends Immunol, 2007. **28**(3): p. 138-45.
356. Egea, J., et al., *Anti-inflammatory role of microglial alpha7 nAChRs and its role in neuroprotection*. Biochem Pharmacol, 2015. **97**(4): p. 463-472.
357. Liu, Y., et al., *alpha7 nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection against dopaminergic neuron loss in an MPTP mouse model via inhibition of astrocyte activation*. J Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 98.
358. Wang, H., et al., *Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis*. Nat Med, 2004. **10**(11): p. 1216-21.
359. Li, Q., et al., *Nicotine reduces TNF-alpha expression through a alpha7 nAChR/MyD88/NF-kB pathway in HBE16 airway epithelial cells*. Cell Physiol Biochem, 2011. **27**(5): p. 605-12.
360. Shaw, S., M. Bencherif, and M.B. Marrero, *Janus kinase 2, an early target of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection against Abeta-(1-42) amyloid*. J Biol Chem, 2002. **277**(47): p. 44920-4.
361. de Jonge, W.J., et al., *Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway*. Nat Immunol, 2005. **6**(8): p. 844-51.
362. Papke, R.L., et al., *Molecular dissection of tropisetron, an alpha7 nicotinic acetylcholine receptor-selective partial agonist*. Neurosci Lett, 2005. **378**(3): p. 140-4.
363. Zwart, R., et al., *Sazetidine-A is a potent and selective agonist at native and recombinant alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptors*. Mol Pharmacol, 2008. **73**(6): p. 1838-43.
364. Wallace, T.L., et al., *Drug targets for cognitive enhancement in neuropsychiatric disorders*. Pharmacol Biochem Behav, 2011. **99**(2): p. 130-45.
365. Mineur, Y.S. and M.R. Picciotto, *Nicotine receptors and depression: revisiting and revising the cholinergic hypothesis*. Trends Pharmacol Sci, 2010. **31**(12): p. 580-6.
366. Martin, L.F., W.R. Kem, and R. Freedman, *Alpha-7 nicotinic receptor agonists: potential new candidates for the treatment of schizophrenia*. Psychopharmacology (Berl), 2004. **174**(1): p. 54-64.
367. Garrison, G.D. and S.E. Dugan, *Varenicline: a first-line treatment option for smoking cessation*. Clin Ther, 2009. **31**(3): p. 463-91.
368. Jensen, A.A., et al., *Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations*. J Med Chem, 2005. **48**(15): p. 4705-45.
369. Badio, B. and J.W. Daly, *Epibatidine, a potent analgetic and nicotinic agonist*. Mol Pharmacol, 1994. **45**(4): p. 563-9.
370. Xiao, Y. and K.J. Kellar, *The comparative pharmacology and up-regulation of rat neuronal nicotinic receptor subtype binding sites stably expressed in transfected mammalian cells*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **310**(1): p. 98-107.

371. Damaj, M.I., et al., *Antinociceptive responses to nicotinic acetylcholine receptor ligands after systemic and intrathecal administration in mice*. J Pharmacol Exp Ther, 1998. **284**(3): p. 1058-65.
372. Khan, I.M., et al., *Nociceptive and antinociceptive responses to intrathecally administered nicotinic agonists*. Neuropharmacology, 1998. **37**(12): p. 1515-25.
373. Cucchiaro, G., N. Chaijale, and K.G. Commons, *The locus coeruleus nucleus as a site of action of the antinociceptive and behavioral effects of the nicotinic receptor agonist, epibatidine*. Neuropharmacology, 2006. **50**(7): p. 769-76.
374. Ganesh, A., et al., *Electrophysiologic effects of systemic and locally infused epibatidine on locus coeruleus neurons*. Eur J Pharmacol, 2008. **584**(1): p. 93-9.
375. Verbitsky, M., et al., *Mixed nicotinic-muscarinic properties of the alpha9 nicotinic cholinergic receptor*. Neuropharmacology, 2000. **39**(13): p. 2515-24.
376. Marubio, L.M., et al., *Reduced antinociception in mice lacking neuronal nicotinic receptor subunits*. Nature, 1999. **398**(6730): p. 805-10.
377. Benowitz, N.L., J. Hukkanen, and P. Jacob, 3rd, *Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers*. Handb Exp Pharmacol, 2009(192): p. 29-60.
378. Matta, S.G., et al., *Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research*. Psychopharmacology (Berl), 2007. **190**(3): p. 269-319.
379. Buccafusco, J.J. and A.V. Terry, Jr., *The potential role of cotinine in the cognitive and neuroprotective actions of nicotine*. Life Sci, 2003. **72**(26): p. 2931-42.
380. Oliver, J.L., et al., *Development of an anti-cotinine vaccine to potentiate nicotine-based smoking cessation strategies*. Vaccine, 2007. **25**(42): p. 7354-62.
381. Papke, R.L., M. Bencherif, and P. Lippiello, *An evaluation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation by quaternary nitrogen compounds indicates that choline is selective for the alpha 7 subtype*. Neurosci Lett, 1996. **213**(3): p. 201-4.
382. Alkondon, M., et al., *Choline is a selective agonist of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons*. Eur J Neurosci, 1997. **9**(12): p. 2734-42.
383. Alkondon, M. and E.X. Albuquerque, *Subtype-specific inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by choline: a regulatory pathway*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **318**(1): p. 268-75.
384. Varanda, W.A., et al., *The acetylcholine receptor of the neuromuscular junction recognizes mecamylamine as a noncompetitive antagonist*. Mol Pharmacol, 1985. **28**(2): p. 128-37.
385. Jensen, A.A., et al., *Carbamoylcholine homologs: novel and potent agonists at neuronal nicotinic acetylcholine receptors*. Mol Pharmacol, 2003. **64**(4): p. 865-75.
386. Imming, P., et al., *Syntheses and evaluation of halogenated cytosine derivatives and of bioisosteric thiocytosine as potent and selective nAChR ligands*. Eur J Med Chem, 2001. **36**(4): p. 375-88.
387. Abin-Carriquiry, J.A., et al., *C3-halogenation of cytosine generates potent and efficacious nicotinic receptor agonists*. Eur J Pharmacol, 2006. **536**(1-2): p. 1-11.
388. Houlihan, L.M., et al., *Activity of cytosine and its brominated isosteres on recombinant human alpha7, alpha4beta2 and alpha4beta4 nicotinic acetylcholine receptors*. J Neurochem, 2001. **78**(5): p. 1029-43.
389. Abin-Carriquiry, J.A., et al., *Increase in locomotor activity after acute administration of the nicotinic receptor agonist 3-bromocytosine in rats*. Eur J Pharmacol, 2010. **634**(1-3): p. 89-94.
390. Bodnar, A.L., et al., *Discovery and structure-activity relationship of quinuclidine benzamides as agonists of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors*. J Med Chem, 2005. **48**(4): p. 905-8.

391. Pandya, A.A. and J.L. Yakel, *Activation of the alpha7 nicotinic ACh receptor induces anxiogenic effects in rats which is blocked by a 5-HT(1a) receptor antagonist*. *Neuropharmacology*, 2013. **70**: p. 35-42.
392. Brunzell, D.H. and J.M. McIntosh, *Alpha7 nicotinic acetylcholine receptors modulate motivation to self-administer nicotine: implications for smoking and schizophrenia*. *Neuropsychopharmacology*, 2012. **37**(5): p. 1134-43.
393. Wishka, D.G., et al., *Discovery of N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]furo[2,3-c]pyridine-5-carboxamide, an agonist of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor, for the potential treatment of cognitive deficits in schizophrenia: synthesis and structure--activity relationship*. *J Med Chem*, 2006. **49**(14): p. 4425-36.
394. Papke, R.L., et al., *The activation and inhibition of human nicotinic acetylcholine receptor by RJR-2403 indicate a selectivity for the alpha4beta2 receptor subtype*. *J Neurochem*, 2000. **75**(1): p. 204-16.
395. Bencherif, M., et al., *RJR-2403: a nicotinic agonist with CNS selectivity I. In vitro characterization*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996. **279**(3): p. 1413-21.
396. Lippiello, P.M., et al., *RJR-2403: a nicotinic agonist with CNS selectivity II. In vivo characterization*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996. **279**(3): p. 1422-9.
397. Damaj, M.I., et al., *Antinociceptive and pharmacological effects of metanicotine, a selective nicotinic agonist*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999. **291**(1): p. 390-8.
398. Rowley, T.J., et al., *The antinociceptive response to nicotinic agonists in a mouse model of postoperative pain*. *Anesth Analg*, 2008. **107**(3): p. 1052-7.
399. Mogg, A.J., et al., *Functional responses and subunit composition of presynaptic nicotinic receptor subtypes explored using the novel agonist 5-iodo-A-85380*. *Neuropharmacology*, 2004. **47**(6): p. 848-59.
400. Kennett, A., D.J. Heal, and S. Wonnacott, *Pharmacological differences between rat frontal cortex and hippocampus in the nicotinic modulation of noradrenaline release implicate distinct receptor subtypes*. *Nicotine Tob Res*, 2012. **14**(11): p. 1339-45.
401. Wildeboer, K.M. and K.E. Stevens, *Stimulation of the alpha4beta2 nicotinic receptor by 5-IA-85380 improves auditory gating in DBA/2 mice*. *Brain Res*, 2008. **1224**: p. 29-36.
402. Cavanagh, J., et al., *SSRI antidepressants do not confound single photon emission computed tomography (SPECT) imaging studies using the alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor [123I]5-I-A85380 ligand: in vivo and in vitro evidence*. *Synapse*, 2010. **64**(2): p. 111-6.
403. Marrero, M.B., et al., *The neuroprotective effect of 2-(3-pyridyl)-1-azabicyclo[3.2.2]nonane (TC-1698), a novel alpha7 ligand, is prevented through angiotensin II activation of a tyrosine phosphatase*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004. **309**(1): p. 16-27.
404. Xiao, Y., et al., *Sazetidine-A, a novel ligand that desensitizes alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors without activating them*. *Mol Pharmacol*, 2006. **70**(4): p. 1454-60.
405. Kuryatov, A. and J. Lindstrom, *Expression of functional human alpha6beta2beta3* acetylcholine receptors in Xenopus laevis oocytes achieved through subunit chimeras and concatamers*. *Mol Pharmacol*, 2011. **79**(1): p. 126-40.
406. Turner, J.R., et al., *Divergent functional effects of sazetidine-a and varenicline during nicotine withdrawal*. *Neuropsychopharmacology*, 2013. **38**(10): p. 2035-47.
407. Bitner, R.S., et al., *Broad-spectrum efficacy across cognitive domains by alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonism correlates with activation of ERK1/2 and CREB phosphorylation pathways*. *J Neurosci*, 2007. **27**(39): p. 10578-87.
408. Thomsen, M.S., et al., *The selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist A-582941 activates immediate early genes in limbic regions of the forebrain: Differential effects in the juvenile and adult rat*. *Neuroscience*, 2008. **154**(2): p. 741-53.

409. Kohlhaas, K.L., et al., *Effects of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonists on antipsychotic efficacy in a preclinical mouse model of psychosis*. Psychopharmacology (Berl), 2012. **220**(4): p. 823-33.
410. Briggs, C.A., et al., *alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist properties of tilorone and related tricyclic analogues*. Br J Pharmacol, 2008. **153**(5): p. 1054-61.
411. Schrimpf, M.R., et al., *SAR of alpha7 nicotinic receptor agonists derived from tilorone: exploration of a novel nicotinic pharmacophore*. Bioorg Med Chem Lett, 2012. **22**(4): p. 1633-8.
412. Woodruff-Pak, D.S., Y.T. Li, and W.R. Kem, *A nicotinic agonist (GTS-21), eyeblink classical conditioning, and nicotinic receptor binding in rabbit brain*. Brain Res, 1994. **645**(1-2): p. 309-17.
413. Kem, W.R., *The brain alpha7 nicotinic receptor may be an important therapeutic target for the treatment of Alzheimer's disease: studies with DMXBA (GTS-21)*. Behav Brain Res, 2000. **113**(1-2): p. 169-81.
414. Stokes, C., et al., *The structural basis for GTS-21 selectivity between human and rat nicotinic alpha7 receptors*. Mol Pharmacol, 2004. **66**(1): p. 14-24.
415. Mahnir, V., et al., *Pharmacokinetics and urinary excretion of DMXBA (GTS-21), a compound enhancing cognition*. Biopharm Drug Dispos, 1998. **19**(3): p. 147-51.
416. Kem, W.R., et al., *Hydroxy metabolites of the Alzheimer's drug candidate 3-[(2,4-dimethoxy)benzylidene]-anabaseine dihydrochloride (GTS-21): their molecular properties, interactions with brain nicotinic receptors, and brain penetration*. Mol Pharmacol, 2004. **65**(1): p. 56-67.
417. Coe, J.W., et al., *In pursuit of alpha4beta2 nicotinic receptor partial agonists for smoking cessation: carbon analogs of (-)-cytisine*. Bioorg Med Chem Lett, 2005. **15**(12): p. 2974-9.
418. Papke, R.L., L. Wecker, and J.A. Stitzel, *Activation and inhibition of mouse muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in Xenopus oocytes*. J Pharmacol Exp Ther, 2010. **333**(2): p. 501-18.
419. Bordia, T., et al., *Varenicline is a potent partial agonist at alpha6beta2* nicotinic acetylcholine receptors in rat and monkey striatum*. J Pharmacol Exp Ther, 2012. **342**(2): p. 327-34.
420. Hendrickson, L.M., et al., *Activation of alpha4* nAChRs is necessary and sufficient for varenicline-induced reduction of alcohol consumption*. J Neurosci, 2010. **30**(30): p. 10169-76.
421. Rollema, H., et al., *Pharmacological profile of the alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist varenicline, an effective smoking cessation aid*. Neuropharmacology, 2007. **52**(3): p. 985-94.
422. Richardson, B.P., et al., *Identification of serotonin M-receptor subtypes and their specific blockade by a new class of drugs*. Nature, 1985. **316**(6024): p. 126-31.
423. Papke, R.L., J.K. Porter Papke, and G.M. Rose, *Activity of alpha7-selective agonists at nicotinic and serotonin 5HT3 receptors expressed in Xenopus oocytes*. Bioorg Med Chem Lett, 2004. **14**(8): p. 1849-53.
424. Rothlin, C.V., et al., *Direct interaction of serotonin type 3 receptor ligands with recombinant and native alpha 9 alpha 10-containing nicotinic cholinergic receptors*. Mol Pharmacol, 2003. **63**(5): p. 1067-74.
425. Kohnomi, S., et al., *Ameliorating effects of tropisetron on dopaminergic disruption of prepulse inhibition via the alpha(7) nicotinic acetylcholine receptor in Wistar rats*. Brain Res, 2010. **1353**: p. 152-8.
426. Bui, J.M. and J.A. McCammon, *Protein complex formation by acetylcholinesterase and the neurotoxin fasciculin-2 appears to involve an induced-fit mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(42): p. 15451-6.

427. Diochot, S., et al., *Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain*. Nature, 2012. **490**(7421): p. 552-5.
428. Karlsson, E., et al., *Snake toxins with high selectivity for subtypes of muscarinic acetylcholine receptors*. Biochimie, 2000. **82**(9-10): p. 793-806.
429. Dubovskii, P.V., A.G. Konshina, and R.G. Efremov, *Cobra cardiotoxins: membrane interactions and pharmacological potential*. Curr Med Chem, 2014. **21**(3): p. 270-87.
430. Carbajal-Saucedo, A., et al., *Isolation, characterization, cloning and expression of an alpha-neurotoxin from the venom of the Mexican coral snake Micrurus laticollaris (Squamata: Elapidae)*. Toxicon, 2013. **66**: p. 64-74.
431. Roy, A., et al., *Structural and functional characterization of a novel homodimeric three-finger neurotoxin from the venom of Ophiophagus hannah (king cobra)*. J Biol Chem, 2010. **285**(11): p. 8302-15.
432. Tsetlin, V.I., *Three-finger snake neurotoxins and Ly6 proteins targeting nicotinic acetylcholine receptors: pharmacological tools and endogenous modulators*. Trends Pharmacol Sci, 2015. **36**(2): p. 109-23.
433. Dutertre, S., A. Nicke, and V.I. Tsetlin, *Nicotinic acetylcholine receptor inhibitors derived from snake and snail venoms*. Neuropharmacology, 2017. **127**: p. 196-223.
434. Tsetlin, V., Y. Utkin, and I. Kasheverov, *Polypeptide and peptide toxins, magnifying lenses for binding sites in nicotinic acetylcholine receptors*. Biochem Pharmacol, 2009. **78**(7): p. 720-31.
435. Marks, M.J., et al., *Nicotinic binding sites in rat and mouse brain: comparison of acetylcholine, nicotine, and alpha-bungarotoxin*. Mol Pharmacol, 1986. **30**(5): p. 427-36.
436. Dupuis, J.P., M. Gauthier, and V. Raymond-Delpech, *Expression patterns of nicotinic subunits alpha2, alpha7, alpha8, and beta1 affect the kinetics and pharmacology of ACh-induced currents in adult bee olfactory neuropiles*. J Neurophysiol, 2011. **106**(4): p. 1604-13.
437. Huang, S., et al., *Complex between alpha-bungarotoxin and an alpha7 nicotinic receptor ligand-binding domain chimaera*. Biochem J, 2013. **454**(2): p. 303-10.
438. Ng, H.J., et al., *Nootropic alpha7 nicotinic receptor allosteric modulator derived from GABAA receptor modulators*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(19): p. 8059-64.
439. Azam, L. and J.M. McIntosh, *Alpha-conotoxins as pharmacological probes of nicotinic acetylcholine receptors*. Acta Pharmacol Sin, 2009. **30**(6): p. 771-83.
440. Kasheverov, I.E., Y.N. Utkin, and V.I. Tsetlin, *Naturally occurring and synthetic peptides acting on nicotinic acetylcholine receptors*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(21): p. 2430-52.
441. Kasheverov, I.E., et al., *High-Affinity alpha-Conotoxin PnIA Analogs Designed on the Basis of the Protein Surface Topography Method*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 36848.
442. Cartier, G.E., et al., *A new alpha-conotoxin which targets alpha3beta2 nicotinic acetylcholine receptors*. J Biol Chem, 1996. **271**(13): p. 7522-8.
443. Champtiaux, N., et al., *Distribution and pharmacology of alpha 6-containing nicotinic acetylcholine receptors analyzed with mutant mice*. J Neurosci, 2002. **22**(4): p. 1208-17.
444. Exley, R., et al., *Striatal dopamine transmission is reduced after chronic nicotine with a decrease in alpha6-nicotinic receptor control in nucleus accumbens*. Eur J Neurosci, 2013. **38**(7): p. 3036-43.
445. McCallum, S.E., et al., *Decrease in alpha3*/alpha6* nicotinic receptors but not nicotine-evoked dopamine release in monkey brain after nigrostriatal damage*. Mol Pharmacol, 2005. **68**(3): p. 737-46.
446. Napier, I.A., et al., *Intrathecal alpha-conotoxins Vc1.1, AuIB and MII acting on distinct nicotinic receptor subtypes reverse signs of neuropathic pain*. Neuropharmacology, 2012. **62**(7): p. 2202-7.

447. Brunzell, D.H., et al., *Alpha-conotoxin MII-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in the nucleus accumbens shell regulate progressive ratio responding maintained by nicotine*. *Neuropsychopharmacology*, 2010. **35**(3): p. 665-73.
448. Gotti, C., et al., *Nicotinic acetylcholine receptors in the mesolimbic pathway: primary role of ventral tegmental area alpha6beta2* receptors in mediating systemic nicotine effects on dopamine release, locomotion, and reinforcement*. *J Neurosci*, 2010. **30**(15): p. 5311-25.
449. Okada, S., et al., *Role of brain nicotinic acetylcholine receptor in centrally administered corticotropin-releasing factor-induced elevation of plasma corticosterone in rats*. *Eur J Pharmacol*, 2008. **587**(1-3): p. 322-9.
450. Shahsavari, A., et al., *Crystal structure of *Lymnaea stagnalis* AChBP complexed with the potent nAChR antagonist DHbetaE suggests a unique mode of antagonism*. *PLoS One*, 2012. **7**(8): p. e40757.
451. Harvey, S.C., F.N. Maddox, and C.W. Luetje, *Multiple determinants of dihydro-beta-erythroidine sensitivity on rat neuronal nicotinic receptor alpha subunits*. *J Neurochem*, 1996. **67**(5): p. 1953-9.
452. Capelli, A.M., et al., *Stable expression and functional characterization of a human nicotinic acetylcholine receptor with alpha6beta2 properties: discovery of selective antagonists*. *Br J Pharmacol*, 2011. **163**(2): p. 313-29.
453. Soll, L.G., et al., *A role for alpha4(non-alpha6)* nicotinic acetylcholine receptors in motor behavior*. *Neuropharmacology*, 2013. **73**: p. 19-30.
454. Guy, E.G. and P.J. Fletcher, *Nicotine-induced enhancement of responding for conditioned reinforcement in rats: role of prior nicotine exposure and alpha4beta2 nicotinic receptors*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2013. **225**(2): p. 429-40.
455. Jackson, K.J., et al., *The alpha3beta4* nicotinic acetylcholine receptor subtype mediates nicotine reward and physical nicotine withdrawal signs independently of the alpha5 subunit in the mouse*. *Neuropharmacology*, 2013. **70**: p. 228-35.
456. Struthers, A.M., et al., *Mecamylamine, dihydro-beta-erythroidine, and dextromethorphan block conditioned responding evoked by the conditional stimulus effects of nicotine*. *Pharmacol Biochem Behav*, 2009. **94**(2): p. 319-28.
457. Absalom, N.L., et al., *Covalent trapping of methyllycaconitine at the alpha4-alpha4 interface of the alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor: antagonist binding site and mode of receptor inhibition revealed*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(37): p. 26521-32.
458. Ward, J.M., et al., *Methyllycaconitine: a selective probe for neuronal alpha-bungarotoxin binding sites*. *FEBS Lett*, 1990. **270**(1-2): p. 45-8.
459. Lockman, P.R., et al., *Chronic nicotine exposure alters blood-brain barrier permeability and diminishes brain uptake of methyllycaconitine*. *J Neurochem*, 2005. **94**(1): p. 37-44.
460. Buckett, W.R., *The pharmacology of pancuronium bromide: a new non-depolarising neuromuscular blocking agent*. *Ir J Med Sci*, 1968. **7**(12): p. 565-8.
461. Wenningmann, I. and J.P. Dilger, *The kinetics of inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by (+)-tubocurarine and pancuronium*. *Mol Pharmacol*, 2001. **60**(4): p. 790-6.
462. Paul, M., et al., *The potency of new muscle relaxants on recombinant muscle-type acetylcholine receptors*. *Anesth Analg*, 2002. **94**(3): p. 597-603; table of contents.
463. Liu, M. and J.P. Dilger, *Site selectivity of competitive antagonists for the mouse adult muscle nicotinic acetylcholine receptor*. *Mol Pharmacol*, 2009. **75**(1): p. 166-73.
464. Jonsson, M., et al., *Distinct pharmacologic properties of neuromuscular blocking agents on human neuronal nicotinic acetylcholine receptors: a possible explanation for the train-of-four fade*. *Anesthesiology*, 2006. **105**(3): p. 521-33.
465. Hunter, A.R., *Hexamethonium bromide*. *Lancet*, 1950. **1**(6598): p. 251.

466. Ascher, P., W.A. Large, and H.P. Rang, *Studies on the mechanism of action of acetylcholine antagonists on rat parasympathetic ganglion cells*. J Physiol, 1979. **295**: p. 139-70.
467. Eaton, J.B., et al., *Characterization of human alpha 4 beta 2-nicotinic acetylcholine receptors stably and heterologously expressed in native nicotinic receptor-null SH-EP1 human epithelial cells*. Mol Pharmacol, 2003. **64**(6): p. 1283-94.
468. Ortiz, N.C., et al., *Varenicline blocks beta2*-nAChR-mediated response and activates beta4*-nAChR-mediated responses in mice in vivo*. Nicotine Tob Res, 2012. **14**(6): p. 711-9.
469. Benwell, M.E., D.J. Balfour, and C.E. Birrell, *Desensitization of the nicotine-induced mesolimbic dopamine responses during constant infusion with nicotine*. Br J Pharmacol, 1995. **114**(2): p. 454-60.
470. Malin, D.H., et al., *Nicotine abstinence syndrome precipitated by central but not peripheral hexamethonium*. Pharmacol Biochem Behav, 1997. **58**(3): p. 695-9.
471. Ford, R.V., J.C. Madison, and J.H. Moyer, *Pharmacology of mecamlamine*. Am J Med Sci, 1956. **232**(2): p. 129-43.
472. Bacher, I., et al., *Mecamylamine - a nicotinic acetylcholine receptor antagonist with potential for the treatment of neuropsychiatric disorders*. Expert Opin Pharmacother, 2009. **10**(16): p. 2709-21.
473. Arias, H.R., et al., *Tricyclic antidepressants and mecamlamine bind to different sites in the human alpha4beta2 nicotinic receptor ion channel*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(6): p. 1007-18.
474. Papke, R.L., P.R. Sanberg, and R.D. Shytle, *Analysis of mecamlamine stereoisomers on human nicotinic receptor subtypes*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **297**(2): p. 646-56.
475. Roegge, C.S. and E.D. Levin, *Nicotinic Receptor Antagonists in Rats*, in *Animal Models of Cognitive Impairment*, E.D. Levin and J.J. Buccafusco, Editors. 2006: Boca Raton (FL).
476. Bertrand, D. and M. Gopalakrishnan, *Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors*. Biochem Pharmacol, 2007. **74**(8): p. 1155-63.
477. Gronlien, J.H., et al., *Distinct profiles of alpha7 nAChR positive allosteric modulation revealed by structurally diverse chemotypes*. Mol Pharmacol, 2007. **72**(3): p. 715-24.
478. Dey, R. and L. Chen, *In search of allosteric modulators of a7-nAChR by solvent density guided virtual screening*. J Biomol Struct Dyn, 2011. **28**(5): p. 695-715.
479. Dickinson, J.A., et al., *Differential coupling of alpha7 and non-alpha7 nicotinic acetylcholine receptors to calcium-induced calcium release and voltage-operated calcium channels in PC12 cells*. J Neurochem, 2007. **100**(4): p. 1089-96.
480. Timmermann, D.B., et al., *An allosteric modulator of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor possessing cognition-enhancing properties in vivo*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **323**(1): p. 294-307.
481. Bertrand, D., et al., *Positive allosteric modulation of the alpha7 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): p. 1407-16.
482. Freitas, K., F.I. Carroll, and M.I. Damaj, *The antinociceptive effects of nicotinic receptors alpha7-positive allosteric modulators in murine acute and tonic pain models*. J Pharmacol Exp Ther, 2013. **344**(1): p. 264-75.
483. Broad, L.M., et al., *Identification and pharmacological profile of a new class of selective nicotinic acetylcholine receptor potentiators*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **318**(3): p. 1108-17.
484. daCosta, C.J. and S.M. Sine, *Stoichiometry for drug potentiation of a pentameric ion channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(16): p. 6595-600.

485. McLean, S.L., et al., *PNU-120596, a positive allosteric modulator of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors, reverses a sub-chronic phencyclidine-induced cognitive deficit in the attentional set-shifting task in female rats*. *J Psychopharmacol*, 2012. **26**(9): p. 1265-70.
486. Kalappa, B.I., et al., *A positive allosteric modulator of alpha7 nAChRs augments neuroprotective effects of endogenous nicotinic agonists in cerebral ischaemia*. *Br J Pharmacol*, 2013. **169**(8): p. 1862-78.
487. Livingstone, P.D., et al., *alpha7 and non-alpha7 nicotinic acetylcholine receptors modulate dopamine release in vitro and in vivo in the rat prefrontal cortex*. *Eur J Neurosci*, 2009. **29**(3): p. 539-50.
488. Hu, M., M. Gopalakrishnan, and J. Li, *Positive allosteric modulation of alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptors: lack of cytotoxicity in PC12 cells and rat primary cortical neurons*. *Br J Pharmacol*, 2009. **158**(8): p. 1857-64.
489. Christensen, D.Z., et al., *Repeated administration of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) agonists, but not positive allosteric modulators, increases alpha7 nAChR levels in the brain*. *J Neurochem*, 2010. **114**(4): p. 1205-16.
490. Pereira, E.F., et al., *Identification and functional characterization of a new agonist site on nicotinic acetylcholine receptors of cultured hippocampal neurons*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1993. **265**(3): p. 1474-91.
491. Samochocki, M., et al., *Galantamine is an allosterically potentiating ligand of neuronal nicotinic but not of muscarinic acetylcholine receptors*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003. **305**(3): p. 1024-36.
492. Kuryatov, A., J. Onksen, and J. Lindstrom, *Roles of accessory subunits in alpha4beta2(*) nicotinic receptors*. *Mol Pharmacol*, 2008. **74**(1): p. 132-43.
493. Ludwig, J., et al., *Localization by site-directed mutagenesis of a galantamine binding site on alpha7 nicotinic acetylcholine receptor extracellular domain*. *J Recept Signal Transduct Res*, 2010. **30**(6): p. 469-83.
494. Kukhtina, V.V., et al., *[MALDI-mass spectrometry for identification of new proteins in snake venoms]*. *Bioorg Khim*, 2000. **26**(11): p. 803-7.
495. Utkin, Y.N., et al., *"Weak toxin" from Naja kaouthia is a nontoxic antagonist of alpha 7 and muscle-type nicotinic acetylcholine receptors*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(19): p. 15810-5.
496. Tamamaki, N., et al., *Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse*. *J Comp Neurol*, 2003. **467**(1): p. 60-79.
497. Zheng, L., U. Baumann, and J.L. Reymond, *An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(14): p. e115.
498. Shelukhina, I.V., et al., *Analysis of specificity of antibodies against synthetic fragments of different neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits*. *Biochemistry (Mosc)*, 2006. **71**(7): p. 749-58.
499. Korotina, A.S., et al., *[Sensitive nonradioactive screening method for compounds interacting with alpha7-cholinoreceptor]*. *Bioorg Khim*, 2003. **29**(4): p. 391-6.
500. Malin, S.A., B.M. Davis, and D.C. Molliver, *Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(1): p. 152-60.
501. Nassenstein, C., et al., *Phenotypic distinctions between neural crest and placodal derived vagal C-fibres in mouse lungs*. *J Physiol*, 2010. **588**(Pt 23): p. 4769-83.
502. Gold, M.S., *Whole-cell recording in isolated primary sensory neurons*. *Methods Mol Biol*, 2012. **851**: p. 73-97.
503. Bracci-Laudiero, L., et al., *NGF modulates CGRP synthesis in human B-lymphocytes: a possible anti-inflammatory action of NGF?* *J Neuroimmunol*, 2002. **123**(1-2): p. 58-65.

504. Filina, J.V., A.G. Gabdoulkhakova, and V.G. Safronova, *RhoA/ROCK downregulates FPR2-mediated NADPH oxidase activation in mouse bone marrow granulocytes*. Cell Signal, 2014. **26**(10): p. 2138-46.
505. Johnson, G.E., *Mammalian cell HPRT gene mutation assay: test methods*. Methods Mol Biol, 2012. **817**: p. 55-67.
506. Pedersen, S.H., et al., *Mechanisms of glyceryl trinitrate provoked mast cell degranulation*. Cephalalgia, 2015. **35**(14): p. 1287-97.
507. Boes, T. and D. Levy, *Influence of sex, estrous cycle, and estrogen on intracranial dural mast cells*. Cephalalgia, 2012. **32**(12): p. 924-31.
508. Shelukhina, I.V., et al., *Presence of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors on dorsal root ganglion neurons proved using knockout mice and selective alpha-neurotoxins in histochemistry*. J Neurochem, 2009. **109**(4): p. 1087-95.
509. Zhang, X., et al., *Localization of neuropeptide Y Y1 receptors in the rat nervous system with special reference to somatic receptors on small dorsal root ganglion neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(24): p. 11738-42.
510. Guo, A., et al., *Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites*. Eur J Neurosci, 1999. **11**(3): p. 946-58.
511. Tsetlin, V., et al., *Detection of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors with the aid of antibodies and toxins*. Life Sci, 2007. **80**(24-25): p. 2202-5.
512. Jones, I.W. and S. Wonnacott, *Precise localization of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors on glutamatergic axon terminals in the rat ventral tegmental area*. J Neurosci, 2004. **24**(50): p. 11244-52.
513. Hillson, E.J., S. Dewitt, and M.B. Hallett, *Optical methods for the measurement and manipulation of cytosolic free calcium in neutrophils*. Methods Mol Biol, 2007. **412**: p. 125-37.
514. Shatillo, A., et al., *Cortical spreading depression induces oxidative stress in the trigeminal nociceptive system*. Neuroscience, 2013. **253**: p. 341-9.
515. Schueler, M., et al., *Extracranial projections of meningeal afferents and their impact on meningeal nociception and headache*. Pain, 2013. **154**(9): p. 1622-31.
516. Henderson, Z. and G.A. Jones, *GABAB receptors in the medial septum/diagonal band slice from 16-25 day rat*. Neuroscience, 2005. **132**(3): p. 789-800.
517. Henderson, Z., et al., *Somato-dendritic nicotinic receptor responses recorded in vitro from the medial septal diagonal band complex of the rodent*. J Physiol, 2005. **562**(Pt 1): p. 165-82.
518. Moser, N., et al., *Evaluating the suitability of nicotinic acetylcholine receptor antibodies for standard immunodetection procedures*. J Neurochem, 2007. **102**(2): p. 479-92.
519. Araud, T., S. Wonnacott, and D. Bertrand, *Associated proteins: The universal toolbox controlling ligand gated ion channel function*. Biochem Pharmacol, 2010. **80**(2): p. 160-9.
520. Williams, M.E., et al., *Ric-3 promotes functional expression of the nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit in mammalian cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(2): p. 1257-63.
521. Lansdell, S.J., et al., *RIC-3 enhances functional expression of multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes in mammalian cells*. Mol Pharmacol, 2005. **68**(5): p. 1431-8.
522. Valles, A.S. and F.J. Barrantes, *Chaperoning alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptors*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1818**(3): p. 718-29.
523. Gu, S., et al., *Brain alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Assembly Requires NACHO*. Neuron, 2016. **89**(5): p. 948-55.

524. Harel, M., et al., *The binding site of acetylcholine receptor as visualized in the X-Ray structure of a complex between alpha-bungarotoxin and a mimotope peptide*. *Neuron*, 2001. **32**(2): p. 265-75.
525. Loughner, C.L., et al., *Organization, evolution and functions of the human and mouse Ly6/uPAR family genes*. *Hum Genomics*, 2016. **10**: p. 10.
526. Adermann, K., et al., *Structural and phylogenetic characterization of human SLURP-1, the first secreted mammalian member of the Ly-6/uPAR protein superfamily*. *Protein Sci*, 1999. **8**(4): p. 810-9.
527. Moriwaki, Y., et al., *Immune system expression of SLURP-1 and SLURP-2, two endogenous nicotinic acetylcholine receptor ligands*. *Life Sci*, 2007. **80**(24-25): p. 2365-8.
528. Moriwaki, Y., et al., *Primary sensory neuronal expression of SLURP-1, an endogenous nicotinic acetylcholine receptor ligand*. *Neurosci Res*, 2009. **64**(4): p. 403-12.
529. Matsumoto, H., et al., *Localization of acetylcholine-related molecules in the retina: implication of the communication from photoreceptor to retinal pigment epithelium*. *PLoS One*, 2012. **7**(8): p. e42841.
530. Chimienti, F., et al., *Identification of SLURP-1 as an epidermal neuromodulator explains the clinical phenotype of Mal de Meleda*. *Hum Mol Genet*, 2003. **12**(22): p. 3017-24.
531. Lyukmanova, E.N., et al., *Human Secreted Ly-6/uPAR Related Protein-1 (SLURP-1) Is a Selective Allosteric Antagonist of alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor*. *PLoS One*, 2016. **11**(2): p. e0149733.
532. Yamauchi, J.G., et al., *Characterizing ligand-gated ion channel receptors with genetically encoded Ca²⁺ sensors*. *PLoS One*, 2011. **6**(1): p. e16519.
533. Marotta, C.B., H.A. Lester, and D.A. Dougherty, *An Unaltered Orthosteric Site and a Network of Long-Range Allosteric Interactions for PNU-120596 in alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptors*. *Chem Biol*, 2015.
534. Gopalakrishnan, S.M., et al., *Functional characterization and high-throughput screening of positive allosteric modulators of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in IMR-32 neuroblastoma cells*. *Assay Drug Dev Technol*, 2011. **9**(6): p. 635-45.
535. McManus, O.B., *HTS assays for developing the molecular pharmacology of ion channels*. *Curr Opin Pharmacol*, 2014. **15**: p. 91-6.
536. Molgo, J., et al., *Physical and virtual screening methods for marine toxins and drug discovery targeting nicotinic acetylcholine receptors*. *Expert Opin Drug Discov*, 2013. **8**(10): p. 1203-23.
537. Lyukmanova, E.N., et al., *Secreted Isoform of Human Lynx1 (SLURP-2): Spatial Structure and Pharmacology of Interactions with Different Types of Acetylcholine Receptors*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 30698.
538. Arredondo, J., et al., *SLURP-2: A novel cholinergic signaling peptide in human mucocutaneous epithelium*. *J Cell Physiol*, 2006. **208**(1): p. 238-45.
539. Messlinger, K., *Migraine: where and how does the pain originate?* *Exp Brain Res*, 2009. **196**(1): p. 179-93.
540. Zhang, Y., et al., *Identifying local and descending inputs for primary sensory neurons*. *J Clin Invest*, 2015. **125**(10): p. 3782-94.
541. Goadsby, P.J., et al., *Neurobiology of migraine*. *Neuroscience*, 2009. **161**(2): p. 327-41.
542. Andreou, A.P., et al., *Modulation of nociceptive dural input to the trigeminocervical complex through GluK1 kainate receptors*. *Pain*, 2015. **156**(3): p. 439-50.
543. Ebersberger, A., et al., *Effect of sympathetic and parasympathetic mediators on the release of calcitonin gene-related peptide and prostaglandin E from rat dura mater, in vitro*. *Cephalalgia*, 2006. **26**(3): p. 282-9.
544. Bolay, H., et al., *Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model*. *Nat Med*, 2002. **8**(2): p. 136-42.

545. Yarnitsky, D., et al., *2003 Wolff Award: Possible parasympathetic contributions to peripheral and central sensitization during migraine*. *Headache*, 2003. **43**(7): p. 704-14.
546. Delepine, L. and P. Aubineau, *Plasma protein extravasation induced in the rat dura mater by stimulation of the parasympathetic sphenopalatine ganglion*. *Exp Neurol*, 1997. **147**(2): p. 389-400.
547. Cady, R., et al., *A double-blind, placebo-controlled study of repetitive transnasal sphenopalatine ganglion blockade with tx360((R)) as acute treatment for chronic migraine*. *Headache*, 2015. **55**(1): p. 101-16.
548. Schytz, H.W., et al., *Carbachol induces headache, but not migraine-like attacks, in patients with migraine without aura*. *Cephalalgia*, 2010. **30**(3): p. 337-45.
549. Grande, G., E. Nilsson, and L. Edvinsson, *Comparison of responses to vasoactive drugs in human and rat cerebral arteries using myography and pressurized cerebral artery method*. *Cephalalgia*, 2013. **33**(3): p. 152-9.
550. Mangione, A.S., et al., *Nonparalytic botulinum molecules for the control of pain*. *Pain*, 2016. **157**(5): p. 1045-55.
551. Lawson, S.N., *Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, Delta- or Aalpha/beta-fibres*. *Exp Physiol*, 2002. **87**(2): p. 239-44.
552. Marszalek, J.R., et al., *Neurofilament subunit NF-H modulates axonal diameter by selectively slowing neurofilament transport*. *J Cell Biol*, 1996. **135**(3): p. 711-24.
553. Parker, M.J., A. Beck, and C.W. Luetje, *Neuronal nicotinic receptor beta2 and beta4 subunits confer large differences in agonist binding affinity*. *Mol Pharmacol*, 1998. **54**(6): p. 1132-9.
554. Bolchi, C., et al., *Design, synthesis and binding affinity of acetylcholine carbamoyl analogues*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013. **23**(23): p. 6481-5.
555. Garcia, R.C., et al., *M1 and M3 muscarinic receptors may play a role in the neurotoxicity of anhydroecgonine methyl ester, a cocaine pyrolysis product*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 17555.
556. Xiao, Y., et al., *Rat alpha3/beta4 subtype of neuronal nicotinic acetylcholine receptor stably expressed in a transfected cell line: pharmacology of ligand binding and function*. *Mol Pharmacol*, 1998. **54**(2): p. 322-33.
557. Kohlmeier, K.A., P.J. Soja, and M.P. Kristensen, *Disparate cholinergic currents in rat principal trigeminal sensory nucleus neurons mediated by M1 and M2 receptors: a possible mechanism for selective gating of afferent sensory neurotransmission*. *Eur J Neurosci*, 2006. **23**(12): p. 3245-58.
558. Chen, S.R., et al., *Differential regulation of primary afferent input to spinal cord by muscarinic receptor subtypes delineated using knockout mice*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(20): p. 14321-30.
559. Dussor, G.O., et al., *Cholinergic modulation of nociceptive responses in vivo and neuropeptide release in vitro at the level of the primary sensory neuron*. *Pain*, 2004. **107**(1-2): p. 22-32.
560. Talavera, K., et al., *Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1*. *Nat Neurosci*, 2009. **12**(10): p. 1293-9.
561. Schreiner, B.S., et al., *Direct action and modulating effect of (+)- and (-)-nicotine on ion channels expressed in trigeminal sensory neurons*. *Eur J Pharmacol*, 2014. **728**: p. 48-58.
562. Vilotti, S., et al., *Expression and function of calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptors in trigeminal ganglia of R192Q Cacna1a knock-in mice*. *Neurosci Lett*, 2016. **620**: p. 104-10.
563. Zhang, X.L., K.M. Albers, and M.S. Gold, *Inflammation-induced increase in nicotinic acetylcholine receptor current in cutaneous nociceptive DRG neurons from the adult rat*. *Neuroscience*, 2015. **284**: p. 483-99.

564. Steen, K.H. and P.W. Reeh, *Actions of cholinergic agonists and antagonists on sensory nerve endings in rat skin, in vitro*. J Neurophysiol, 1993. **70**(1): p. 397-405.
565. Bernardini, N., et al., *Excitatory nicotinic and desensitizing muscarinic (M2) effects on C-nociceptors in isolated rat skin*. J Neurosci, 2001. **21**(9): p. 3295-302.
566. Alimohammadi, H. and W.L. Silver, *Evidence for nicotinic acetylcholine receptors on nasal trigeminal nerve endings of the rat*. Chem Senses, 2000. **25**(1): p. 61-6.
567. Sekizawa, S.I. and H. Tsubone, *Nasal receptors responding to noxious chemical irritants*. Respir Physiol, 1994. **96**(1): p. 37-48.
568. Djouhri, L. and S.N. Lawson, *Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals*. Brain Res Brain Res Rev, 2004. **46**(2): p. 131-45.
569. Simonetti, M., et al., *Comparison of P2X and TRPV1 receptors in ganglia or primary culture of trigeminal neurons and their modulation by NGF or serotonin*. Mol Pain, 2006. **2**: p. 11.
570. Zakharov, A., et al., *Hunting for origins of migraine pain: cluster analysis of spontaneous and capsaicin-induced firing in meningeal trigeminal nerve fibers*. Front Cell Neurosci, 2015. **9**: p. 287.
571. Sucher, N.J., T.P. Cheng, and S.A. Lipton, *Neural nicotinic acetylcholine responses in sensory neurons from postnatal rat*. Brain Res, 1990. **533**(2): p. 248-54.
572. Genzen, J.R., W. Van Cleve, and D.S. McGehee, *Dorsal root ganglion neurons express multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes*. J Neurophysiol, 2001. **86**(4): p. 1773-82.
573. Rau, K.K., R.D. Johnson, and B.Y. Cooper, *Nicotinic AChR in subclassified capsaicin-sensitive and -insensitive nociceptors of the rat DRG*. J Neurophysiol, 2005. **93**(3): p. 1358-71.
574. Liu, L., et al., *Identification of acetylcholine receptors in adult rat trigeminal ganglion neurons*. Brain Res, 1993. **617**(1): p. 37-42.
575. Keiger, C.J. and J.C. Walker, *Individual variation in the expression profiles of nicotinic receptors in the olfactory bulb and trigeminal ganglion and identification of alpha2, alpha6, alpha9, and beta3 transcripts*. Biochem Pharmacol, 2000. **59**(3): p. 233-40.
576. Albers, K.M., et al., *Artemin growth factor increases nicotinic cholinergic receptor subunit expression and activity in nociceptive sensory neurons*. Mol Pain, 2014. **10**: p. 31.
577. Smith, N.J., et al., *Comparative functional expression of nAChR subtypes in rodent DRG neurons*. Front Cell Neurosci, 2013. **7**: p. 225.
578. Cao, X.H., et al., *Diabetic neuropathy enhances voltage-activated Ca²⁺ channel activity and its control by M4 muscarinic receptors in primary sensory neurons*. J Neurochem, 2011. **119**(3): p. 594-603.
579. Nandigama, R., et al., *Muscarinic acetylcholine receptor subtypes expressed by mouse bladder afferent neurons*. Neuroscience, 2010. **168**(3): p. 842-50.
580. Genzen, J.R. and D.S. McGehee, *Short- and long-term enhancement of excitatory transmission in the spinal cord dorsal horn by nicotinic acetylcholine receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(11): p. 6807-12.
581. Li, D.P., et al., *Role of presynaptic muscarinic and GABA(B) receptors in spinal glutamate release and cholinergic analgesia in rats*. J Physiol, 2002. **543**(Pt 3): p. 807-18.
582. Brenneis, C., et al., *Phenotyping the Function of TRPV1-Expressing Sensory Neurons by Targeted Axonal Silencing*. J Neurosci, 2013. **33**(1): p. 315-326.
583. Mitchell, K., et al., *Ablation of rat TRPV1-expressing Delta/C-fibers with resiniferatoxin: analysis of withdrawal behaviors, recovery of function and molecular correlates*. Mol Pain, 2010. **6**: p. 94.

584. Ringkamp, M., et al., *Capsaicin responses in heat-sensitive and heat-insensitive A-fiber nociceptors*. J Neurosci, 2001. **21**(12): p. 4460-8.
585. Dajas-Bailador, F. and S. Wonnacott, *Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling*. Trends Pharmacol Sci, 2004. **25**(6): p. 317-24.
586. Ween, H., et al., *Alpha3* and alpha 7 nAChR-mediated Ca²⁺ transient generation in IMR-32 neuroblastoma cells*. Neurochem Int, 2010. **57**(3): p. 269-77.
587. Fang, X., et al., *Intense isolectin-B4 binding in rat dorsal root ganglion neurons distinguishes C-fiber nociceptors with broad action potentials and high Nav1.9 expression*. J Neurosci, 2006. **26**(27): p. 7281-92.
588. Woolf, C.J. and Q. Ma, *Nociceptors--noxious stimulus detectors*. Neuron, 2007. **55**(3): p. 353-64.
589. Tominaga, M., et al., *The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli*. Neuron, 1998. **21**(3): p. 531-43.
590. Wetsel, W.C., *Sensing hot and cold with TRP channels*. Int J Hyperthermia, 2011. **27**(4): p. 388-98.
591. Kobayashi, K., et al., *Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with delta/c-fibers and colocalization with trk receptors*. J Comp Neurol, 2005. **493**(4): p. 596-606.
592. Price, T.J. and C.M. Flores, *Critical evaluation of the colocalization between calcitonin gene-related peptide, substance P, transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 immunoreactivities, and isolectin B4 binding in primary afferent neurons of the rat and mouse*. J Pain, 2007. **8**(3): p. 263-72.
593. Gibson, S.J., et al., *Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight other species*. J Neurosci, 1984. **4**(12): p. 3101-11.
594. Kashihara, Y., M. Sakaguchi, and M. Kuno, *Axonal transport and distribution of endogenous calcitonin gene-related peptide in rat peripheral nerve*. J Neurosci, 1989. **9**(11): p. 3796-802.
595. Olesen, J., et al., *Origin of pain in migraine: evidence for peripheral sensitisation*. Lancet Neurol, 2009. **8**(7): p. 679-90.
596. Franco-Cereceda, A., M. Rydh, and C.J. Dalsgaard, *Nicotine- and capsaicin-, but not potassium-evoked CGP-release from cultured guinea-pig spinal ganglia is inhibited by Ruthenium red*. Neurosci Lett, 1992. **137**(1): p. 72-4.
597. Hua, X.Y., et al., *Pharmacology of calcitonin gene related peptide release from sensory terminals in the rat trachea*. Can J Physiol Pharmacol, 1995. **73**(7): p. 999-1006.
598. Kawasaki, H., et al., *Paracrine control of mesenteric perivascular axo-axonal interaction*. Acta Physiol (Oxf), 2011. **203**(1): p. 3-11.
599. Levy, D., et al., *Mast cell degranulation activates a pain pathway underlying migraine headache*. Pain, 2007. **130**(1-2): p. 166-76.
600. Munoz-Cruz, S., et al., *Gender-related effects of sex steroids on histamine release and FcepsilonRI expression in rat peritoneal mast cells*. J Immunol Res, 2015. **2015**: p. 351829.
601. Rozniecki, J.J., et al., *Morphological and functional demonstration of rat dura mater mast cell-neuron interactions in vitro and in vivo*. Brain Res, 1999. **849**(1-2): p. 1-15.
602. Strassman, A.M., et al., *Axon diameters and intradural trajectories of the dural innervation in the rat*. J Comp Neurol, 2004. **473**(3): p. 364-76.
603. Theoharides, T.C., et al., *The role of mast cells in migraine pathophysiology*. Brain Res Brain Res Rev, 2005. **49**(1): p. 65-76.
604. Levy, D., *Migraine pain, meningeal inflammation, and mast cells*. Curr Pain Headache Rep, 2009. **13**(3): p. 237-40.
605. Smith, J.H., J.H. Butterfield, and F.M. Cutrer, *Primary headache syndromes in systemic mastocytosis*. Cephalalgia, 2011. **31**(15): p. 1522-31.

606. Levy, D., et al., *Mast cell degranulation distinctly activates trigemino-cervical and lumbosacral pain pathways and elicits widespread tactile pain hypersensitivity*. *Brain Behav Immun*, 2012. **26**(2): p. 311-7.
607. Durham, P.L. and A.F. Russo, *Stimulation of the calcitonin gene-related peptide enhancer by mitogen-activated protein kinases and repression by an antimigraine drug in trigeminal ganglia neurons*. *J Neurosci*, 2003. **23**(3): p. 807-15.
608. Giniatullin, R., et al., *Calcitonin gene-related peptide rapidly downregulates nicotinic receptor function and slowly raises intracellular Ca²⁺ in rat chromaffin cells in vitro*. *J Neurosci*, 1999. **19**(8): p. 2945-53.
609. Fabbretti, E., et al., *Delayed upregulation of ATP P2X3 receptors of trigeminal sensory neurons by calcitonin gene-related peptide*. *J Neurosci*, 2006. **26**(23): p. 6163-71.
610. Ishikawa, F. and S. Miyazaki, *New biodefense strategies by neutrophils*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2005. **53**(3): p. 226-33.
611. Takashima, A. and Y. Yao, *Neutrophil plasticity: acquisition of phenotype and functionality of antigen-presenting cell*. *J Leukoc Biol*, 2015. **98**(4): p. 489-96.
612. Segal, A.W., *How neutrophils kill microbes*. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 197-223.
613. Jaillon, S., et al., *Neutrophils in innate and adaptive immunity*. *Semin Immunopathol*, 2013. **35**(4): p. 377-94.
614. Wessler, I., et al., *Blockade of nicotinic and muscarinic receptors facilitates spontaneous migration of human peripheral granulocytes: failure in cystic fibrosis*. *Life Sci*, 2012. **91**(21-22): p. 1119-21.
615. Cormier, A., et al., *Long-term exposure to nicotine modulates the level and activity of acetylcholine receptors in white blood cells of smokers and model mice*. *Mol Pharmacol*, 2004. **66**(6): p. 1712-8.
616. Kim, T.H., S.J. Kim, and S.M. Lee, *Stimulation of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor protects against sepsis by inhibiting Toll-like receptor via phosphoinositide 3-kinase activation*. *J Infect Dis*, 2014. **209**(10): p. 1668-77.
617. Su, X., M.A. Matthay, and A.B. Malik, *Requisite role of the cholinergic alpha7 nicotinic acetylcholine receptor pathway in suppressing Gram-negative sepsis-induced acute lung inflammatory injury*. *J Immunol*, 2010. **184**(1): p. 401-10.
618. Chi, F., et al., *Meningitic Escherichia coli K1 penetration and neutrophil transmigration across the blood-brain barrier are modulated by alpha7 nicotinic receptor*. *PLoS One*, 2011. **6**(9): p. e25016.
619. Yu, J.Y., et al., *Repositioning of Memantine as a Potential Novel Therapeutic Agent against Meningitic E. coli-Induced Pathogenicities through Disease-Associated Alpha7 Cholinergic Pathway and RNA Sequencing-Based Transcriptome Analysis of Host Inflammatory Responses*. *PLoS One*, 2015. **10**(5): p. e0121911.
620. Iho, S., et al., *Nicotine induces human neutrophils to produce IL-8 through the generation of peroxynitrite and subsequent activation of NF-kappaB*. *J Leukoc Biol*, 2003. **74**(5): p. 942-51.
621. Brechard, S. and E.J. Tschirhart, *Regulation of superoxide production in neutrophils: role of calcium influx*. *J Leukoc Biol*, 2008. **84**(5): p. 1223-37.
622. Kabbani, N. and R.A. Nichols, *Beyond the Channel: Metabotropic Signaling by Nicotinic Receptors*. *Trends Pharmacol Sci*, 2018. **39**(4): p. 354-366.
623. Brechard, S., A. Salsmann, and E.J. Tschirhart, *OAG induces an additional PKC-, PI3K-, and Rac2-mediated signaling pathway up-regulating NOX2 activity, independently of Ca²⁺ entry*. *J Leukoc Biol*, 2009. **85**(4): p. 638-47.
624. Carrichon, L., et al., *Characterization of superoxide overproduction by the D-Loop(Nox4)-Nox2 cytochrome b(558) in phagocytes-Differential sensitivity to calcium and phosphorylation events*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1808**(1): p. 78-90.

625. Foyouzi-Youssefi, R., et al., *Chemoattractant-induced respiratory burst: increases in cytosolic Ca²⁺ concentrations are essential and synergize with a kinetically distinct second signal*. *Biochem J*, 1997. **322** (Pt 3): p. 709-18.
626. McIntosh, J.M., et al., *Analogs of alpha-conotoxin MII are selective for alpha6-containing nicotinic acetylcholine receptors*. *Mol Pharmacol*, 2004. **65**(4): p. 944-52.
627. Hogg, R.C., et al., *Single amino acid substitutions in alpha-conotoxin PnIA shift selectivity for subtypes of the mammalian neuronal nicotinic acetylcholine receptor*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(51): p. 36559-64.
628. Luo, S., et al., *Single-residue alteration in alpha-conotoxin PnIA switches its nAChR subtype selectivity*. *Biochemistry*, 1999. **38**(44): p. 14542-8.
629. Altman, J. and G.D. Das, *Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats*. *J Comp Neurol*, 1965. **124**(3): p. 319-35.
630. Amrein, I., K. Isler, and H.P. Lipp, *Comparing adult hippocampal neurogenesis in mammalian species and orders: influence of chronological age and life history stage*. *Eur J Neurosci*, 2011. **34**(6): p. 978-87.
631. Burgess, N., E.A. Maguire, and J. O'Keefe, *The human hippocampus and spatial and episodic memory*. *Neuron*, 2002. **35**(4): p. 625-41.
632. Schmidt-Hieber, C., P. Jonas, and J. Bischofberger, *Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus*. *Nature*, 2004. **429**(6988): p. 184-7.
633. Wang, S., B.W. Scott, and J.M. Wojtowicz, *Heterogenous properties of dentate granule neurons in the adult rat*. *J Neurobiol*, 2000. **42**(2): p. 248-57.
634. Doetsch, F. and R. Hen, *Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian brain*. *Curr Opin Neurobiol*, 2005. **15**(1): p. 121-8.
635. Hagg, T., *Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view*. *Trends Neurosci*, 2005. **28**(11): p. 589-95.
636. Kang, J.I. and E. Vaucher, *Cholinergic pairing with visual activation results in long-term enhancement of visual evoked potentials*. *PLoS One*, 2009. **4**(6): p. e5995.
637. Mansvelder, H.D. and D.S. McGehee, *Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine*. *Neuron*, 2000. **27**(2): p. 349-57.
638. Lauder, J.M. and U.B. Schambra, *Morphogenetic roles of acetylcholine*. *Environ Health Perspect*, 1999. **107 Suppl 1**: p. 65-9.
639. Role, L.W. and D.K. Berg, *Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses*. *Neuron*, 1996. **16**(6): p. 1077-85.
640. Frazier, C.J., et al., *Acetylcholine activates an alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic current in rat hippocampal interneurons, but not pyramidal cells*. *J Neurosci*, 1998. **18**(4): p. 1187-95.
641. Kim, K.K., R.S. Adelstein, and S. Kawamoto, *Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(45): p. 31052-61.
642. Moores, C.A., et al., *Mechanism of microtubule stabilization by doublecortin*. *Mol Cell*, 2004. **14**(6): p. 833-9.
643. Ming, G.L. and H. Song, *Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions*. *Neuron*, 2011. **70**(4): p. 687-702.
644. Crespo, D., B.B. Stanfield, and W.M. Cowan, *Evidence that late-generated granule cells do not simply replace earlier formed neurons in the rat dentate gyrus*. *Exp Brain Res*, 1986. **62**(3): p. 541-8.
645. Freund, T.F. and G. Buzsaki, *Interneurons of the hippocampus*. *Hippocampus*, 1996. **6**(4): p. 347-470.
646. Zhao, C., et al., *Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus*. *J Neurosci*, 2006. **26**(1): p. 3-11.

647. Kee, N., et al., *Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus*. Nat Neurosci, 2007. **10**(3): p. 355-62.
648. Clelland, C.D., et al., *A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation*. Science, 2009. **325**(5937): p. 210-3.
649. Zhao, B., M. Zhong, and K. Jin, *Neurogenesis and neurodegenerative diseases in human*. Panminerva Med, 2008. **50**(1): p. 55-64.
650. Snyder, J.S., N. Kee, and J.M. Wojtowicz, *Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus*. J Neurophysiol, 2001. **85**(6): p. 2423-31.
651. Chang, K.T. and D.K. Berg, *Voltage-gated channels block nicotinic regulation of CREB phosphorylation and gene expression in neurons*. Neuron, 2001. **32**(5): p. 855-65.
652. Nakayama, H., et al., *Nicotine-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase and CREB in PC12h cells*. J Neurochem, 2001. **79**(3): p. 489-98.
653. Sweatt, J.D., *The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory*. J Neurochem, 2001. **76**(1): p. 1-10.
654. Nestler, E.J., *Common molecular and cellular substrates of addiction and memory*. Neurobiol Learn Mem, 2002. **78**(3): p. 637-47.
655. Malenka, R.C. and M.F. Bear, *LTP and LTD: an embarrassment of riches*. Neuron, 2004. **44**(1): p. 5-21.
656. Lagostena, L., et al., *The partial alpha7 nicotine acetylcholine receptor agonist S 24795 enhances long-term potentiation at CA3-CA1 synapses in the adult mouse hippocampus*. Neuropharmacology, 2008. **54**(4): p. 676-85.
657. Matsuyama, S., et al., *Activation of nicotinic acetylcholine receptors induces long-term potentiation in vivo in the intact mouse dentate gyrus*. Eur J Neurosci, 2000. **12**(10): p. 3741-7.
658. Ji, D., R. Lape, and J.A. Dani, *Timing and location of nicotinic activity enhances or depresses hippocampal synaptic plasticity*. Neuron, 2001. **31**(1): p. 131-41.
659. Ge, S. and J.A. Dani, *Nicotinic acetylcholine receptors at glutamate synapses facilitate long-term depression or potentiation*. J Neurosci, 2005. **25**(26): p. 6084-91.
660. Welsby, P., M. Rowan, and R. Anwyl, *Nicotinic receptor-mediated enhancement of long-term potentiation involves activation of metabotropic glutamate receptors and ryanodine-sensitive calcium stores in the dentate gyrus*. Eur J Neurosci, 2006. **24**(11): p. 3109-18.
661. Welsby, P.J., M.J. Rowan, and R. Anwyl, *Intracellular mechanisms underlying the nicotinic enhancement of LTP in the rat dentate gyrus*. Eur J Neurosci, 2009. **29**(1): p. 65-75.
662. Campbell, N.R., et al., *Endogenous signaling through alpha7-containing nicotinic receptors promotes maturation and integration of adult-born neurons in the hippocampus*. J Neurosci, 2010. **30**(26): p. 8734-44.
663. Samii, A., J.G. Nutt, and B.R. Ransom, *Parkinson's disease*. Lancet, 2004. **363**(9423): p. 1783-93.
664. Quik, M., et al., *Targeting nicotinic receptors for Parkinson's disease therapy*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2011. **10**(6): p. 651-8.
665. Quik, M., et al., *Role for the nicotinic cholinergic system in movement disorders; therapeutic implications*. Pharmacol Ther, 2014. **144**(1): p. 50-9.
666. Cachepe, R., et al., *Selective activation of cholinergic interneurons enhances accumbal phasic dopamine release: setting the tone for reward processing*. Cell Rep, 2012. **2**(1): p. 33-41.
667. Ugrumov, M.V., et al., *Modeling of presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism in mice*. Neuroscience, 2011. **181**: p. 175-88.
668. Jakowec, M.W. and G.M. Petzinger, *1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned model of parkinson's disease, with emphasis on mice and nonhuman primates*. Comp Med, 2004. **54**(5): p. 497-513.

669. Riederer, P. and S. Wuketich, *Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis.* J Neural Transm, 1976. **38**(3-4): p. 277-301.
670. Bezard, E., C.E. Gross, and J.M. Brotchie, *Presymptomatic compensation in Parkinson's disease is not dopamine-mediated.* Trends Neurosci, 2003. **26**(4): p. 215-21.
671. Kolacheva, A.A., et al., *Time course of degeneration of dopaminergic neurons and respective compensatory processes in the nigrostriatal system in mice.* Dokl Biol Sci, 2014. **456**(1): p. 160-4.
672. Salminen, O., et al., *The subunit composition and pharmacology of alpha-Conotoxin MII-binding nicotinic acetylcholine receptors studied by a novel membrane-binding assay.* Neuropharmacology, 2005. **48**(5): p. 696-705.
673. Klink, R., et al., *Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei.* J Neurosci, 2001. **21**(5): p. 1452-63.
674. Zoli, M., et al., *Identification of the nicotinic receptor subtypes expressed on dopaminergic terminals in the rat striatum.* J Neurosci, 2002. **22**(20): p. 8785-9.
675. Suzuki, S., et al., *3-[(2,4-Dimethoxy)benzylidene]-anabaseine dihydrochloride protects against 6-hydroxydopamine-induced parkinsonian neurodegeneration through alpha7 nicotinic acetylcholine receptor stimulation in rats.* J Neurosci Res, 2013. **91**(3): p. 462-71.
676. Hu, J., et al., *Dynamic alterations of gene expression of nicotinic acetylcholine receptor alpha7, alpha4 and beta2 subunits in an acute MPTP-lesioned mouse model.* Neurosci Lett, 2011. **494**(3): p. 232-6.
677. Bordia, T., et al., *The alpha7 nicotinic receptor agonist ABT-107 protects against nigrostriatal damage in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions.* Exp Neurol, 2015. **263**: p. 277-84.
678. Kawamata, J., S. Suzuki, and S. Shimohama, *alpha7 nicotinic acetylcholine receptor mediated neuroprotection in Parkinson's disease.* Curr Drug Targets, 2012. **13**(5): p. 623-30.
679. Gao, H.M., et al., *Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease.* J Neurochem, 2002. **81**(6): p. 1285-97.
680. Huston, J.M., *The vagus nerve and the inflammatory reflex: wandering on a new treatment paradigm for systemic inflammation and sepsis.* Surg Infect (Larchmt), 2012. **13**(4): p. 187-93.
681. Nizri, E. and T. Brenner, *Modulation of inflammatory pathways by the immune cholinergic system.* Amino Acids, 2013. **45**(1): p. 73-85.
682. Prickaerts, J., et al., *EVP-6124, a novel and selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, improves memory performance by potentiating the acetylcholine response of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors.* Neuropharmacology, 2012. **62**(2): p. 1099-110.
683. Biton, B., et al., *SSR180711, a novel selective alpha7 nicotinic receptor partial agonist: (1) binding and functional profile.* Neuropsychopharmacology, 2007. **32**(1): p. 1-16.
684. Horenstein, N.A. and R.L. Papke, *Anti-inflammatory Silent Agonists.* ACS Med Chem Lett, 2017. **8**(10): p. 989-991.
685. Bowman, W.C., *Neuromuscular block.* Br J Pharmacol, 2006. **147 Suppl 1**: p. S277-86.
686. Cavallo, J.S., B.N. Hamilton, and J. Farley, *Behavioral and neural bases of extinction learning in *Hermisenda*.* Front Behav Neurosci, 2014. **8**: p. 277.
687. Raverty, W.D., R.H. Thomson, and T.J. King, *Metabolites from the sponge *Pachymatisma johnstoni*; L-6-bromo-hypaphorine, a new amino-acid (and its crystal structure).* J Chem Soc Perkin 1, 1977(10): p. 1204-11.

688. Longeon, A., et al., *Bioactive indole derivatives from the South Pacific marine sponges *Rhopaloeides odorabile* and *Hyrtios* sp.* Mar Drugs, 2011. **9**(5): p. 879-88.
689. Mollica, A., et al., *Synthesis and bioactivity of secondary metabolites from marine sponges containing dibrominated indolic systems.* Molecules, 2012. **17**(5): p. 6083-99.
690. Dauphin, A., et al., *Fungal hypaphorine reduces growth and induces cytosolic calcium increase in root hairs of *Eucalyptus globulus*.* Protoplasma, 2007. **231**(1-2): p. 83-8.
691. Ozawa, M., et al., *Hypaphorine, an indole alkaloid from *Erythrina velutina*, induced sleep on normal mice.* Bioorg Med Chem Lett, 2008. **18**(14): p. 3992-4.
692. Jimenez, E.C., M. Watkins, and B.M. Olivera, *Multiple 6-bromotryptophan residues in a sleep-inducing peptide.* Biochemistry, 2004. **43**(38): p. 12343-8.
693. Mazurov, A.A., J.D. Speake, and D. Yohannes, *Discovery and development of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor modulators.* J Med Chem, 2011. **54**(23): p. 7943-61.
694. Mazurov, A., T. Hauser, and C.H. Miller, *Selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor ligands.* Curr Med Chem, 2006. **13**(13): p. 1567-84.
695. O'Donnell, C.J., et al., *Discovery of 4-(5-methyloxazolo[4,5-b]pyridin-2-yl)-1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonane (CP-810,123), a novel alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor agonist for the treatment of cognitive disorders in schizophrenia: synthesis, SAR development, and in vivo efficacy in cognition models.* J Med Chem, 2010. **53**(3): p. 1222-37.
696. Guandalini, L., et al., *Design, synthesis, and preliminary pharmacological evaluation of new quinoline derivatives as nicotinic ligands.* J Med Chem, 2007. **50**(20): p. 4993-5002.
697. Wintersteiner, O. and J.D. Dutcher, *Curare Alkaloids from *Chondodendron Tomentosum*.* Science, 1943. **97**(2525): p. 467-70.
698. Habre, W., et al., *The involvement of histaminic and muscarinic receptors in the bronchoconstriction induced by myorelaxant administration in sensitized rabbits.* Anesth Analg, 2008. **107**(6): p. 1899-906.
699. Bornia, E.C., et al., *Presynaptic M1, M2, and A1 receptors play roles in tetanic fade induced by pancuronium or cisatracurium.* J Anesth, 2009. **23**(4): p. 513-9.
700. Torii, Y., et al., *Comparison of effects of botulinum toxin subtype A1 and A2 using twitch tension assay and rat grip strength test.* Toxicon, 2011. **57**(1): p. 93-9.
701. Tuba, Z., S. Maho, and E.S. Vizi, *Synthesis and structure-activity relationships of neuromuscular blocking agents.* Curr Med Chem, 2002. **9**(16): p. 1507-36.
702. Meakin, G.H., *Recent advances in myorelaxant therapy.* Paediatr Anaesth, 2001. **11**(5): p. 523-31.
703. Brams, M., et al., *A structural and mutagenic blueprint for molecular recognition of strychnine and d-tubocurarine by different cys-loop receptors.* PLoS Biol, 2011. **9**(3): p. e1001034.
704. Zhang, R., et al., *The role of loop F residues in determining differential d-tubocurarine potencies in mouse and human 5-hydroxytryptamine 3A receptors.* Biochemistry, 2007. **46**(5): p. 1194-204.
705. Paul, M., et al., *Antiemetics of the 5-hydroxytryptamine 3A antagonist class inhibit muscle nicotinic acetylcholine receptors.* Anesth Analg, 2005. **101**(3): p. 715-21, table of contents.
706. Wotring, V.E. and K.W. Yoon, *The inhibitory effects of nicotinic antagonists on currents elicited by GABA in rat hippocampal neurons.* Neuroscience, 1995. **67**(2): p. 293-300.
707. daCosta, C.J., C.R. Free, and S.M. Sine, *Stoichiometry for alpha-bungarotoxin block of alpha7 acetylcholine receptors.* Nat Commun, 2015. **6**: p. 8057.
708. Chatzidaki, A., et al., *The influence of allosteric modulators and transmembrane mutations on desensitisation and activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors.* Neuropharmacology, 2015. **97**: p. 75-85.

709. Gill, J.K., et al., *Contrasting properties of alpha7-selective orthosteric and allosteric agonists examined on native nicotinic acetylcholine receptors*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e55047.
710. Sine, S.M., *End-plate acetylcholine receptor: structure, mechanism, pharmacology, and disease*. Physiol Rev, 2012. **92**(3): p. 1189-234.
711. Jonsson Fagerlund, M., M. Dabrowski, and L.I. Eriksson, *Pharmacological characteristics of the inhibition of nondepolarizing neuromuscular blocking agents at human adult muscle nicotinic acetylcholine receptor*. Anesthesiology, 2009. **110**(6): p. 1244-52.
712. Karpen, J.W. and G.P. Hess, *Acetylcholine receptor inhibition by d-tubocurarine involves both a competitive and a noncompetitive binding site as determined by stopped-flow measurements of receptor-controlled ion flux in membrane vesicles*. Biochemistry, 1986. **25**(7): p. 1786-92.
713. Bowman, W.C., et al., *Structure:action relationships among some desacetoxo analogues of pancuronium and vecuronium in the anesthetized cat*. Anesthesiology, 1988. **69**(1): p. 57-62.
714. Lien, C.A., *Development and potential clinical impairment of ultra-short-acting neuromuscular blocking agents*. Br J Anaesth, 2011. **107 Suppl 1**: p. i60-71.
715. Utkin, Y.N., et al., *Azemiopsin from Azemiops feae viper venom, a novel polypeptide ligand of nicotinic acetylcholine receptor*. J Biol Chem, 2012. **287**(32): p. 27079-86.
716. Montilla-Garcia, A., et al., *Grip strength in mice with joint inflammation: A rheumatology function test sensitive to pain and analgesia*. Neuropharmacology, 2017. **125**: p. 231-242.
717. Nevins, M.E., S.A. Nash, and P.M. Beardsley, *Quantitative grip strength assessment as a means of evaluating muscle relaxation in mice*. Psychopharmacology (Berl), 1993. **110**(1-2): p. 92-6.
718. van Miert, M.M., et al., *The pharmacokinetics and pharmacodynamics of rocuronium in patients with hepatic cirrhosis*. Br J Clin Pharmacol, 1997. **44**(2): p. 139-44.
719. Dragne, A., et al., *Rocuronium pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship under stable propofol or isoflurane anesthesia*. Can J Anaesth, 2002. **49**(4): p. 353-60.
720. Vandembrom, R.H., J.M. Wierda, and S. Agoston, *Pharmacokinetics and neuromuscular blocking effects of atracurium besylate and two of its metabolites in patients with normal and impaired renal function*. Clin Pharmacokinet, 1990. **19**(3): p. 230-40.
721. Szenohradszky, J., et al., *Pharmacokinetics of rocuronium bromide (ORG 9426) in patients with normal renal function or patients undergoing cadaver renal transplantation*. Anesthesiology, 1992. **77**(5): p. 899-904.
722. Lebrault, C., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of vecuronium (ORG NC 45) in patients with cirrhosis*. Anesthesiology, 1985. **62**(5): p. 601-5.
723. Ginsburg, S., R.J. Kitz, and J.J. Savarese, *Neuromuscular blocking activity of a new series of quaternary N-substituted choline esters*. Br J Pharmacol, 1971. **43**(1): p. 107-26.
724. Descotes, J., *Immunotoxicology: role in the safety assessment of drugs*. Drug Saf, 2005. **28**(2): p. 127-36.
725. Peroni, D.G., et al., *Muscle relaxants allergy*. Int J Immunopathol Pharmacol, 2011. **24**(3 Suppl): p. S35-46.
726. Reddy, J.I., et al., *Anaphylaxis is more common with rocuronium and succinylcholine than with atracurium*. Anesthesiology, 2015. **122**(1): p. 39-45.
727. Matsuoka, A., M. Hayashi, and M. Ishidate, Jr., *Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro*. Mutat Res, 1979. **66**(3): p. 277-90.
728. Zan, U., M. Topaktas, and E.S. Istifli, *In vitro genotoxicity of rocuronium bromide in human peripheral lymphocytes*. Cytotechnology, 2011. **63**(3): p. 239-45.

729. Moore, E.W. and J.M. Hunter, *The new neuromuscular blocking agents: do they offer any advantages?* Br J Anaesth, 2001. **87**(6): p. 912-25.
730. Kim, Y.B., T.Y. Sung, and H.S. Yang, *Factors that affect the onset of action of non-depolarizing neuromuscular blocking agents.* Korean J Anesthesiol, 2017. **70**(5): p. 500-510.