

СТИМУЛЯЦІЯ ХОЛІНОГЕНЕЗУ В КУЛЬТУРІ ФЕТАЛЬНИХ НЕРВОВИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ

Метою дослідження було отримання в культурі популяції нервових клітин, збагаченої холінергічними нейронами та їхніми детермінованими попередниками. Встановлено, що найбільш ефективною комбінацією нейроіндукторів, що стимулювала диференціювання холінергічних нейронів із стовбурових нервових клітин, виявилось поєднання ретиноевої кислоти та ацетилхоліну. Протягом періоду культивування чисельність ChAT-позитивних клітин достовірно зростає з $5,3 \pm 2,9$ до $21,1 \pm 6,2$ %, в той же час у контрольних зразках їхня концентрація становила $9,1 \pm 4,8$ % загальної кількості клітин. Збагачення клітинної популяції холінергічними нейронами та їхніми детермінованими попередниками корелювало зі зростанням рівня активності ацетилхоліністерази. Таким чином, додавання ретиноевої кислоти та ацетилхоліну стимулювало як нейрогенез, так і холіногенез в культурі фетальних нервових клітин людини.

Вступ. Дослідження процесів формування нейромедіаторних шляхів, зокрема холіногенезу, безперечно вважаються важливою галуззю сучасної нейрофізіології. Патології цих процесів, викликані генетичними порушеннями або ускладненнями різної етіології, є основною складовою неврологічних захворювань [1].

Під час ембріогенезу холінергічні нейрони найперше з'являються в спинному мозку та стовбурі головного мозку. Холінергічний фенотип (наявність ChAT-позитивних клітин) виявляється через 1–2 доби після формування популяції нейронів із прогеніторних клітин, розташованих в гермінальних зонах [2]. На початкових етапах диференціювання такі клітини зберігають здатність до поділу та міграції, що дозволяє утворювати холінергічну мережу центральної нервової системи [3].

Робота *in vitro* відкриває можливість детального вивчення послідовності формування диференційованих холінергічних нейронів із стовбурових клітин нервової системи. Дослідження

в культурі нейронів різної нейромедіаторної специфічності відбувалося ще на початкових етапах становлення цього методу — з 70-х років XX сторіччя [4, 5]. Тоді з'ясували, що синтез та розпад нейромедіаторів, функціонування синапсів відбувається так само, як і *in vivo*, таким чином підтвердивши правомірність застосування таких дослідів як моделі [4, 5]. Нині відкриття генів, що регулюють дофаміно-, адрено- та холіногенез, а також молекул-нейроіндукторів, які впливають на експресію цих генів, дало можливість направленої регуляції диференціювання стовбурових клітин нервової системи по тому чи іншому нейромедіаторному типу, тим самим привернувши увагу наукового світу до цієї проблеми [6–10].

Регуляція холіногенезу в організмі здійснюється комплексом факторів, що несуть позиційну, контактну та іншу сигнальну інформацію, яку прогеніторні клітини здатні сприймати на різних стадіях свого розвитку. Доведено, що такі регуляційні молекули, як ретиноева кислота, NGF, CNTF, BMP-9, беруть активну участь у цьому процесі [8–11].

Таким чином, в останні роки дослідження холіногенезу відбувалося в двох основних напрямках — генетичному, тобто дослідження експресії генів-регуляторів цього процесу, та молекулярному, тобто аналіз ролі нейротрофічних факторів та інших інформаційно важливих молекул. Поєднання даних дає можливість дослідникам впливати на холіногенез завдяки регуляції експресії відповідних генів.

Актуальність таких досліджень обумовлена потребами сучасної клінічної практики, зокрема застосування клітинної терапії для лікування неврологічних порушень. Перспективним напрямком розвитку клітинної нейротрансплантації є використання нейрональних клітин-попередників із заданою програмою диференціювання, зокрема певної нейромедіа-

© В.І. ЦИМБАЛЮК, І.Г. ВАСИЛЬЄВА,
Н.П. ОЛЕКСЕНКО, Н.Г. ЧОПИК, О.І. ЦЮБКО,
О.С. ГАЛАНТА, 2013

торної специфічності. У зв'язку з цим важливим є отримання популяції детермінованих попередників ацетилхолінергічних нейронів, що беруть участь в регуляції процесів руху і можуть бути застосовані при лікуванні відповідних порушень, зокрема викликаних хворобою Паркінсона, тому пошук джерел цих клітин набуває все більшої актуальності.

Нейрональна популяція, в складі якої наявні і холінергічні нейрони, отримана *in vitro* Coleman et al. [6] з лінії P19 клітин ембріональної карциноми під впливом ретиноєвої кислоти. Пізніше такі клітинні популяції були експериментально виведені з клітинних ліній PC12 і C2C12 та нейробластами людини [7, 12].

Отримані таким чином холінергічні нейрони безперечно можуть використовуватися як модель для експерименту, але перспектива їхнього застосування для нейротрансплантації викликає запитання. Тому метою нашої роботи було отримання популяції, максимально збагаченої новоутвореними холінергічними нейронами та їхніми детермінованими попередниками із стовбурових клітин фетальної нервової системи людини для подальшого використання як трансплантаційного матеріалу при лікуванні рухових порушень. Створення такої методики дозволить значно збільшити ефективність клітинної терапії.

Матеріали та методи. Для виконання експериментальної частини роботи використовували наступні реактиви: розчин Хенкса («ПанЕко», РФ), середовище Ігла («ПанЕко», РФ), сироватку великої рогатої худоби («БіолоТ», РФ), поліетиленімін («Sigma», США), параформальдегід («Janssen Chemica», Бельгія), барвник трипановий синій («Janssen Chemica», Бельгія), ретиноєву кислоту («Sigma», США), ацетилхолін йодид («Sigma», США), ацетилхолін хлорид («Sigma», США), реактив Елмана («Sigma», США), фактори EGF та FGF («Sigma», США), антитіла до β -тубуліну III та холінацетилтрансферази (ХАТ) («Dako», Данія), вторинні антитіла Multivision Polymer Detection («Dako», Данія).

Культивування клітин. Для культивування використовували кріоконсервовану суспензію нервових клітин ембріонального мозку людини. Тканину суспендували у розчині Хенкса шляхом механічного піпетування, доводили концентрацію клітин до $1-3 \cdot 10^6$ в 1 мл [13].

Суспензію розливали у стерильні чашки Петрі на скельця, вкриті поліетиленіміном.

Впродовж 1 тижня зразки культивували на середовищі Ігла, збагаченому факторами EGF та FGF в концентрації 20 нг/мл, із додаванням термоінактивованої сироватки великої рогатої худоби [14].

Стимуляцію направлено диференціювання клітин здійснювали додаванням ретиноєвої кислоти в концентрації 1 мкМ та ацетилхоліну 0,58 мкМ [11]. При цьому контрольні зразки культивували на середовищі стандартного складу, збагаченому 10%-ною сироваткою великої рогатої худоби.

На 9-ту та 11-ту добу культуральні зразки фіксували для подальших досліджень.

Загальну кількість клітин підраховували в гемоцитометрі за допомогою забарвлення 0,2%-ним розчином трипанового синього [13].

Імуногістохімічний аналіз. Для подальшого проведення імуногістохімічних реакцій культуральні зразки фіксували 4%-ним параформальдегідом при 4 °С. Використовували первинні антитіла до β -тубуліну III та холінацетилтрансферази (ChAT) у розведенні 1:50 та 1:250 відповідно [15, 16]. Візуалізацію зв'язування здійснювали за допомогою системи вторинних антитіл Multivision Polymer Detection. Мишині антитіла мітили пероксидазою хрину, кролячі – кислотою фосфатазою.

Обчислення процентного вмісту клітин різних типів проводили за результатами підрахунків їхньої чисельності в десяти полях зору світлового мікроскопа («ЛОМО», РФ).

Активність ацетилхолінестерази (АХЕ). Активність ферменту визначали за допомогою спектрофотометричного методу Елмана [17]. Як субстрат використовували ацетилхолін йодид, інтенсивність забарвлення вимірювали на довжині хвилі 412 нм за допомогою спектрофотометра СФ-26 («ЛОМО», РФ).

Результати досліджень та їх обговорення. В нашій роботі як вихідний матеріал для культивування використовували фетальну нервову тканину людини 9–10 тижнів гестації, яка за нашими попередніми дослідженнями з експресії ранніх генів холіногенезу є найбільш придатною для стимуляції цього процесу [18].

Ступінь диференціювання клітинної популяції в напрямку формування холінергічної

мережі оцінювали за наявністю ChAT⁺-позитивних клітин. Присутність ключового ферменту синтезу ацетилхоліну є безперечним доказом приналежності таких клітин до холінергічних нейронів. Крім цього, враховували загальну чисельність нейрональної фракції по наявності β-тубулінIII⁺-позитивних клітин, що дало змогу слідкувати за змінами процентного вмісту холінергічних нейронів серед усіх інших. Присутність β-тубуліну III типу є важливим показником стану новосформованої нейрональної популяції в культурі та часто використовується для характеристики змін її складу в під час культивування або впливу тих чи інших реагентів [19–21].

Так, у висхідному матеріалі для культивування фракція ChAT⁺ нейронів становила 5,3 %, а загальна чисельність нейронів (β-тубулінIII⁺) – 17,1 % клітинного складу (таблиця). Згідно з даними літератури така клітинна популяція знаходиться у фазі активного формування нейрональної фракції, адже вміст нейронів в ній варіює в межах проміжних значень. Так, за даними Carpenter et al. [19] в недиференційованій клітинній популяції нервової систе-

ми людини міститься 3–5 % β-тубулінIII⁺-клітин, а там, де процеси формування нейронів завершилися, – до 30 %.

У фазі розмноження під впливом мітогенів EGF та FGFβ спостерігалася тенденція до збільшення чисельності β-тубулінIII⁺- та ChAT⁺-клітин (таблиця), можливо за рахунок новоутворених нейронів, що зберігають здатність до поділу, серед який присутні і холінергічні. Наявність мітозів у ChAT⁺-позитивних клітинах підтверджено в роботах Schammbra et al. [3] під час дослідження гермінальних зон. Нами встановлено, що ChAT⁺-нейрони формують групи і майже не зустрічаються поодиночі. Отже, в культурі новоутворені за рахунок мітозів ChAT⁺-нейрони встановлювали контакти з близьким сусіднім оточенням, формуючи невеликі клони.

Фаза диференціювання продемонструвала неоднакове зростання фракції холінергічних нейронів. В контрольній групі, що культивувалася на середовищі стандартного складу, спостерігалася невелике зростання чисельності нейронів взагалі і холінергічних нейронів в їх складі (таблиця). Можливість довільного дифе-

Процентний вміст нейронів (β-тубулінIII⁺-клітини) та їх холінергічної фракції (ChAT⁺-клітини) за результатами імуногістохімічного виявлення різних типів нервових клітин в культурі фетальної нервової тканини людини

Строк культивування та поживне середовище	Кількість клітин в полі зору, %		Вміст живих клітин, %
	β-тубулінIII ⁺	ChAT ⁺	
Висхідний контроль	17,1 ± 3,6	5,3 ± 2,9	80
Фаза розмноження			
7 діб DMEM, 10 % термоактивованої сироватки BPX, EGF, FGFβ	28,1 ± 6,8	8,0 ± 3,1	92
Фаза диференціювання			
9 діб контроль	34,7 ± 5,3	6,5 ± 2,9	90
додавання ацетилхоліну	37,2 ± 7,6	6,0 ± 2,2	88
додавання ретиноєвої кислоти	42,3 ± 5,0	8,2 ± 3,0	91
додавання ацетилхоліну та ретиноєвої кислоти	43,7 ± 8,5	14,9 ± 5,5 *	90
11 діб контроль	36,5 ± 5,4	9,1 ± 4,8	87
додавання ацетилхоліну	38,8 ± 5,6	17,3 ± 5,5 *	88
додавання ретиноєвої кислоти	44,8 ± 5,0	14,3 ± 5,1	90
додавання ацетилхоліну та ретиноєвої кислоти	46,4 ± 6,7	21,1 ± 6,2 *	90

Примітка. BPX – велика рогата худоба. * P < 0,05.

ренціювання ChAT⁺-нейронів із стовбурових клітин нервової системи встановлена Liu et al. [16]. В нашій роботі максимальний вміст фракції ChAT⁺ клітин в контрольній групі дорівнював 9,1 %, при цьому β -тубулінIII⁺-позитивних – 34,7 %. Такий вміст нейронів спостерігається при виході значень їхньої чисельності на плато і становить в різних клітинних популяціях 20–37 % [19–21]. Це є свідченням повної реалізації потенціалу нейрогенезу в клітинній популяції.

Таким чином, процеси нейронального диференціювання відбуваються в стандартних культуральних умовах, але вміст ChAT⁺-клітин значно не змінюється, отже відбувається лише підтримка вже сформованих холінергічних нейронів та їхніх детермінованих попередників.

Додавання в поживне середовище ацетилхоліну спричиняє збільшення чисельності холінергічних нейронів, особливо помітне на 11-ту добу – 17,3 %, при цьому значного зростання кількості β -тубулінIII⁺-клітин не спостерігалося (таблиця). При додаванні в культуральне середовище ацетилхоліну характерні групи ChAT-позитивних клітин збільшувалися у розмірах. Чисельність холінергічних нейронів в них досягала кількох десятків, ускладнювалася структура. Згідно з нашими даними диференціювання нейронів із стовбурових клітин відбувалося так само, як і в контролі, але процентний вміст холінергічних серед них збільшувався, тобто наявність ацетилхоліну направлено стимулює холіногенез серед інших типів нейрогенезу.

Вірогідно, цей нейромедіатор є важливим агентом позиційної інформації. В умовах *in vivo* ацетилхолін та інші регуляторні речовини надходять у нейрони лише при встановленні міжклітинних контактів. У культурі клітин є можливість моделювати відповідні умови, додаючи їх безпосередньо у поживне середовище. При наявності нейромедіатора в нейрональних клітинах-попередниках запускається механізм диференціювання, при відсутності відбувається програмована загибель клітини – апоптоз. Оскільки встановлення контактів є важливою умовою виживання нейронів, то, можливо, штучна активація холінергічних рецепторів в культурі сприяє виживанню відповідних нейронів. Ця система є складовою частиною регуляції

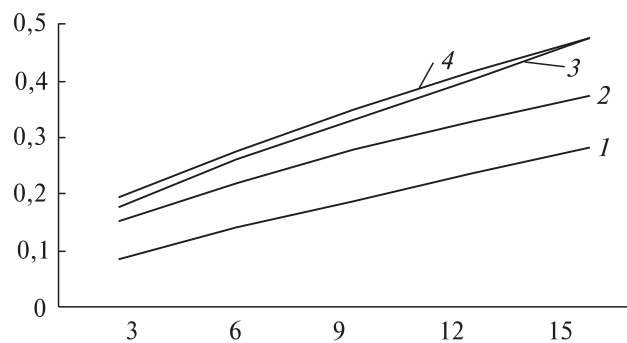


Рис. 4. Активність ацетилхолінестерази в контрольних та експериментальних культурах ембріонального головного мозку людини. 11-та доба культивування: 1 – контроль; 2 – ацетилхолін; 3 – ретиноева кислота; 4 – ацетилхолін + ретиноева кислота

чисельності нейронів і виникнення нейромедіаторних провідних шляхів в онтогенезі.

Наступна серія експериментів стосувалася використання ретиноевої кислоти як нейроіндуктора. Додавання цієї сполуки в культуральне середовище спричиняло підвищення чисельності β -тубулінIII⁺-клітин до 44,8 % (таблиця). ChAT⁺-клітини спостерігалися також у вигляді великих груп. Наявність у поживному середовищі ретиноевої кислоти сприяло незначному збільшенню їхньої чисельності (таблиця), але на нашу думку це відбувалося за рахунок стимуляції нейрогенезу взагалі, а не підтримки диференціювання за холінергічним типом.

Механізм стимуляції нейрогенезу ретиноевою кислотою не визначений до кінця, але відомо, що під впливом ретиноїд-індукованих протеїнів відбувається реорганізація цитоскелету і формування аксонів [22, 23].

В останній серії експерименту нашою метою було поєднати стимулюючі ефекти ретиноевої кислоти та ацетилхоліну. Обидві речовини додавали в поживне середовище одночасно, одразу по закінченні фази розмноження.

Отримані результати свідчать про те, що такий вплив виявився найбільш ефективним (рис. 1–3, див. вклейку в кінці номера). Згідно з результатами, наведеними в таблиці, найбільший вміст β -тубулін III⁺- та ChAT⁺-клітин отриманий саме в цій серії експериментів. Фракція холінергічних нейронів складала 21,1 % клітинної популяції. На гістологічних препаратах зафіксовано формування нейрональних

ланцюжків з β -тубулінIII⁺- та ChAT⁺-клітин (рис. 2). Отже, в цьому випадку ми спостерігали стимуляцію диференціювання стовбурових клітин нервової системи в нейрони та подальше направлене формування холінергічних нейронів.

Функціональну зрілість отриманих в умовах *in vitro* холінергічних нейронів досліджували за допомогою вимірювання активності ацетилхолінестерази (АХЕ), наявність якої свідчить про формування холінергічних синапсів і тому є маркером кінцевих стадій холіногенезу. Найбільшу активність АХЕ спостерігали при одночасному додаванні ацетилхоліну та ретиноевої кислоти (рис. 4). Найвірогідніше, присутність обох індукторів сприймається клітинами як наявність холінергічної мережі і запускає подальші процеси диференціювання, пов'язані з активацією відповідного комплексу генів.

Висновки. Наявність ацетилхоліну в культуральному середовищі стимулює холіногенез, не впливаючи на загальну чисельність нейронів, що формуються із стовбурових клітин. Додавання ретиноевої кислоти стимулює нейрогенез, і підвищення чисельності холінергічних нейронів відбувається за рахунок збільшення кількості нейронів взагалі. Одночасне використання ацетилхоліну та ретиноевої кислоти стимулює як нейрогенез, так і холіногенез, і тому є найбільш ефективною комбінацією для збільшення чисельності холінергічних нейронів в клітинній популяції.

V.I. Tsybaluk, I.G. Vasilyeva, N.P. Olexenko,
N.G. Chopic, O.I. Tsybko, E.S. Galanta

Institute of neurosurgery n. acad. A. Romodanov AMS
of Ukraine
E-mail: N.Oleksenko@gmail.com

STIMULATION OF CHOLINOGENESIS IN THE HUMAN FETAL NERVE CELLS CULTURE

The aim of the research was to establish cultured population of nerve cells reached by cholinergic neurons and their determinative precursors. The most effective combination of neuroinductors which stimulated cholinergic cells differentiation from the nerve stem cells was retinoic acid and acetylcholine. During the period of culturing the amount of ChAT⁺ cells reliably increased from $5,3 \pm 2,9$ % to $21,1 \pm 6,2$ %. At the same time in the control samples their concentration was $9,1 \pm 4,8$ % of total cell count. Enrichment of cell population by cholinergic neurons and their determinative pre-

cursors correlated with increasing of AChE-activity level. So, addition of retinoic acid and acetylcholine stimulate both neurogenesis and cholinogenesis in the culture of human fetal nerve cells.

V.I. Tsybaluk, I.G. Vasilyeva, N.P. Olexenko,
N.G. Chopic, O.I. Tsybko, E.S. Galanta

СТИМУЛЯЦИЯ ХОЛИНОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ ФЕТАЛЬНЫХ НЕРВНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Целью исследования было получение в культуре популяции нервных клеток, обогащенной холинэргическими нейронами и их детерминированными предшественниками. Установлено, что наиболее эффективной комбинацией нейроиндукторов, стимулировавшей дифференцировку холинэргических нейронов из стволовых клеток, оказалось совместное применение ретиноевой кислоты и ацетилхолина. На протяжении периода культивирования количество ChAT⁺-позитивных клеток достоверно увеличилось с $5,3 \pm 2,9$ до $21,1 \pm 6,2$ %, в то же время в контрольных образцах их концентрация составляла $9,1 \pm 4,8$ % общего количества клеток. Обогащение клеточной популяции холинэргическими нейронами и их детерминированными предшественниками коррелировало с увеличением уровня активности ацетилхолинэстеразы. Таким образом, добавление ретиноевой кислоты и ацетилхолина стимулировало как нейрогенез, так и холиногенез в культуре фетальных нервных клеток человека.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Perry E.K., Jonson M., Ekonomou A. et al. Neurogenic abnormalities in Alzheimer's disease differ between stages of neurogenesis and partly related to cholinergic pathology // *Neurobiol. Dis.* – 2012. – 47, № 2. – P. 155–162.
2. Lauder J.M., Schambra U.B. Morphogenic roles of acetylcholine // *Environ. Health Persp.* – 1999. – 107. – P. 65–69.
3. Schambra U.B., Sulik K.K., Petrusz P., Lauder J.M. Ontogeny of cholinergic neurons in the mouse forebrain // *J. Comp. Neurol.* – 1989. – 288. – P. 101–140.
4. Barald K.F., Berg D.K. High affinity uptake by spinal cord neurons in dissociated cell cultures // *Develop. Biol.* – 1978. – 65. – P. 90–99.
5. Honegger P., Richelson E. Neurotransmitter synthesis, storage and release by aggregating cell cultures of rat brain // *J. Brain Res.* – 1979. – 162. – P. 89–101.
6. Coleman B.A., Palmer T. Regulation of acetylcholinesterase expression during neuronal differentiation // *J. Biol. Chem.* – 1996. – 271, № 8. – P. 4410–4416.

7. *El Omri A., Han J., Kawada K. et al.* Luteolin enhances cholinergic activities in PC12 cells through ERK1/2 and PI3K/Akt pathways // *J. Brain Res.* – 2012. – **1437**, № 9. – P. 16–25.
8. *Janiesch P.C., Krüger H.S., Pöshel B. et al.* Cholinergic control in developing prefrontal-hippocampal networks // *J. Neurosci.* – 2011. – **31**, № 49. – P. 17955–17970.
9. *Janacait G.M., Pratt L., Acevedo C., Ni L.* Microglial regulation of cholinergic differentiation in the basal forebrain // *Dev. Neurobiol.* – 2012. – **72**, № 6. – P. 857–864.
10. *Allard S., Leon W.C., Pakavathkumar P. et al.* Impact of the NGF maturation and degradation pathway on the cortical cholinergic system phenotype // *J. Neurosci.* – 2012. – **8**, № 6. – P. 2002–2012.
11. *Kotasova H., Vesela I., Kucera J. et al.* Phosphoinositide-3-kinase inhibition enables retinoic-acid-induced neurogenesis in monolayer culture of embryonic stem cells // *J. Cell Biochem.* – 2012. – **113**, № 2. – P. 563–570.
12. *Bourdeaut F., Janoueix-Lerosey I., Lucchesi C. et al.* Cholinergic switch associated with morphological differentiation in neuroblastoma // *J. Pathol.* – 2009. – **219**, № 4. – P. 463–472.
13. *Божкова В.П., Брежестовский Л.А., Буравлев В.М. и др.* Руководство по культивированию нервной ткани. – М.: Наука, 1988. – 318 с.
14. *Svendsen C.N., Borg M.G., Armstrong R.E. et al.* A new method for the rapid and long-term growth of human neural precursor cells // *J. Neurosci. Meth.* – 1998. – **85**. – P. 141–152.
15. *Minguell J.J., Fierro F.A., Epuban M.J. et al.* Non-stimulated human uncommitted mesenchymal stem cells express cell markers of mesenchymal and neuronal lineages // *Stem cells Dev.* – 2005. – **14**, № 4. – P. 408–414.
16. *Liu X., Zhu Y., Gao W.* Isolation of neural stem cells from the spinal cords of low temperature preserved abortus // *J. Neurosci. Meth.* – 2006. – **157**, № 1. – P. 64–70.
17. *Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity // *Pharmacology.* – 1961. – **7**. – P. 88–95.
18. *Цимбалюк В.І., Васильєва І.Г., Олексенко Н.П., Чопик Н.Г., Цюбко О.І., Галанта О.С.* Дослідження потенціалу диференціювання ацетилхолінергічних нейронів у культурі стовбурових клітин головного мозку ембріонів людини // *Укр. неврол. журн.* – 2010. – № 2. – С. 94–97.
19. *Carpenter M.K., Cui X., Hu Z. et al.* In vitro expansion of a multipotent population of human neural precursor cells // *Exp. Neurol.* – 1999. – **158**. – P. 265–278.
20. *Asai D., Remolana N.* Tubulin isotype usage in vivo: A unique spatial distribution of the minor neural-specific β -tubulin isotype in pheochromocytoma cells // *Dev. Biol.* – 1989. – **132**. – P. 398–409.
21. *Frankfurter A., Binder L.I., Rebhun L.* Limited tissue distribution of a novel β -tubulin isoform // *J. Cell Biol.* – 1986. – **103**. – P. 273.
22. *Maltman D.J., Christie V.B., Collings J.C. et al.* Proteomic profiling of the stem cell response to retinoic acid and synthetic retinoid analogues: identification of major retinoid-inducible proteins // *Mol. Biosyst.* – 2009. – **5**, № 5. – P. 458–471.
23. *Nilbratt M., Friberg L., Mousavi M. et al.* Retinoic acid and nerve growth factor induce differential regulation of nicotinic acetylcholine receptor subunit expression in SN56 cells // *J. Neurosci. Res.* – 2007. – **85**, № 3. – P. 504–514.

Надійшла 05.06.12