

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

*на правах рукописи*

Шелухина Ирина Валерьевна

НИКОТИНОВЫЕ И РОДСТВЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ  
НЕЙРОМЕДИАТОРОВ: МЕХАНИЗМЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ  
АКТИВНОСТИ И НОВЫЕ ЛИГАНДЫ

02.00.10 – Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени  
доктора химических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в Лаборатории молекулярной токсикологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)

**Научный консультант:**

**Цетлин Виктор Ионович, д.х.н., чл.-корр. РАН,** заведующий Отделом молекулярной нейроиммунной сигнализации ИБХ РАН

**Официальные оппоненты:**

**Пинелис Всеволод Григорьевич, д.м.н., профессор,** главный научный сотрудник Лаборатории нейробиологии и фундаментальных основ развития мозга Федерального государственного автономного учреждения Министерства здравоохранения Российской Федерации Национального медицинского исследовательского Центра Здоровья Детей

**Кочетков Сергей Николаевич, д.х.н., академик РАН,** заведующий Лабораторией молекулярных основ действия физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

**Гудашева Татьяна Александровна, д.б.н., чл.-корр. РАН,** заведующая Отделом химии лекарственных средств Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

Защита состоится «23» сентября 2020 г. в 10:00 на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук по адресу 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук, а также на сайте Института [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru).

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,

доктор физико-математических наук Олейников В. А.



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Рецепция нейромедиаторов лежит в основе электрохимической нервной передачи между возбудимыми клетками в организме человека и животных. Классическими представителями ионотропных рецепторов нейромедиаторов является семейство Cys-петельных рецепторов, которое на основе консервативного пентамерного трехдоменного строения объединяет никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAХР), рецепторы  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК), глицина и серотонина (подтип 5-НТ3). Функциональная роль этих рецепторов не ограничена участием в синаптической передаче, т.к. они часто располагаются на нейронах вне синаптических контактов, выполняя регуляторные функции, а также их экспрессия присуща многим невозбудимым клеткам (глиальным, иммунным, эпителиальным и др.). Это объясняется тем, что клеточная сигнализация с использованием таких молекул как ацетилхолин эволюционно предшествовала развитию полноценной электрохимической нервной передачи. Для некоторых Cys-петельных рецепторов недавно появились данные о возможности метаботропной внутриклеточной сигнализации, что еще более усложняет выстраивание общей картины их функциональной роли в организме.

Нарушение функционирования Cys-петельных рецепторов 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  $\alpha 7$  nAХР 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. Весьма актуальной является детализация имеющихся научных знаний и обнаружение новых аспектов функциональной роли Cys-петельных рецепторов как в нервной системе, так и за ее пределами.

Исторически многие открытия базовых молекулярных механизмов активности ионных каналов связаны именно с работами в области Cys-петельных рецепторов. Интерес к этой сфере не угасает и в настоящее время, что подчеркивается циклом недавних работ, в которых впервые удалось получить и исследовать кристаллические структуры основных представителей Cys-петельных рецепторов. 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, 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 Cys-петельных рецепторов, что обусловлено появлением более совершенных инструментальных методов характеристики функциональной активности ионных каналов.

Настоящая работа была направлена на обнаружение новых механизмов функциональной активности Cys-петельных рецепторов в организме, поиск их новых фармакологически-перспективных лигандов и детализацию механизмов лиганд-рецепторных взаимодействий.

**Цель работы и основные задачи исследования.** 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 Cys-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  $\alpha$ -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 nAHR в механизмах нейропластичности взрослого мозга грызунов в физиологическом состоянии и при моделировании патологии;
- 6) поиск новых низкомолекулярных агонистов и антагонистов различных подтипов nAHR и определение специфичности, аффинности, кинетики, механизма и других особенностей их связывания с рецепторами;
- 7) доклинические исследования эффективности и безопасности лекарственного средства на основе синтетического полипептида аземиопсина, компонента яда бирманской гадюки *Azemiops feae*, в качестве миорелаксанта.

**Научная новизна и практическая значимость работы.** В настоящей работе в рамках создания комплексного методического подхода были предложены новые методы цито- и гистохимической идентификации и анализа аффинности к лигандам Cys-петельных рецепторов с использованием трехпетельных  $\alpha$ -нейротоксинов змей, а также впервые разработан вариант кальциевого имиджинга активности nAHR с одноволновым генетически-кодируемым сенсором. Впервые продемонстрировано ингибирование природных подтипов ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов трехпетельными  $\alpha$ -нейротоксинами змей, классическими высокоаффинными конкурентными антагонистами nAHR. Для наиболее эффективного ингибитора ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов,  $\alpha$ -кобратоксина, подтвержден конкурентный механизм связывания, основанный на ключевой роли положительного заряда его центральной петли, а также обнаружена дополнительная аллостерическая компонента связывания. Для, синтетического трехпетельного белка SLURP-1 человека, структурного аналога  $\alpha$ -нейротоксинов змей, впервые установлено предпочтительное ингибирование гетеромерных nAHR. На основе пептидного конкурентного ингибитора мышечного nAHR (аземиопсина из яда *Azemiops feae*) разработано лекарственное средство, успешно прошедшее доклинические исследования в качестве недеполяризующего миорелаксанта.

Впервые установлено, что холинергическая иннервация усиливает болевую сигнализацию в оболочках головного мозга, месте зарождения болей при мигрени, регулирует двухфазным образом специфические защитные реакции нейтрофилов мышц при воспалении, действуя на  $\alpha 7$ ,  $\alpha 3\beta 2$  и  $\alpha 6^*$  nAHR, а также способствует дифференцировке новообразованных нейронов в гиппокампе грызунов посредством активации  $\alpha 7$  nAHR и критична для протекания компенсаторных процессов на досимптомной стадии в модели болезни Паркинсона. Впервые определены молекулярные мишени проноцицептивного действия парасимпатической холинергической нервной системы в оболочках головного мозга. Впервые установлена предпочтительная экспрессия и аксональный транспорт  $\alpha 7$  nAHR в ноцицептивных нейронах сенсорных ганглиев, иммунопозитивных к пептиду CGRP, одному из основных медиаторов болей при мигрени.

Открыты новые фармакологически-перспективные низкомолекулярные агонисты и антагонисты nAHR природного и синтетического происхождения. Проведенный структурно-функциональный анализ их свойств позволил получить новую информацию о ключевых элементах  $\alpha 7$  nAHR-селективного фармакофора у производных хинолина и гипафорина, а также о чертах строения алкалоидов *d*-тубокураринового типа, ответственных за селективность к nAHR.

Практическая значимость работы состоит в усовершенствовании нейрхимической методологической базы, выяснении новых аспектов роли nAHR и родственных рецепторов нейромедиаторов в патофизиологических процессах, а также открытии и характеристике свойств их новых фармакологически-перспективных

лигандов (в том числе доклинически испытанного недеполяризующего миорелаксанта), что может в дальнейшем послужить для корректировки имеющихся или разработки новых подходов фармакотерапии.

**Публикация и апробация работы.** Результаты данной работы были представлены на российских и международных научных симпозиумах и конференциях в виде пленарных, симпозиальных и постерных докладов, в том числе на Международной научной конференции по биоорганической химии «XII чтения памяти акад. Овчинникова Ю.А.» и VIII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Москва, 2017); II, III и IV Немецко-российских симпозиумах «Молекулярная нейробиология сегодня и завтра» (Москва, 2012 и 2017 и Берлин, Германия, 2014), ряде конференций Международного общества нейрхимиков (ISN, Афины, Греция 2011, Канкун, Мексика, 2013, Токио, Япония, 2014, Кернс, Австралия 2015); 38-м международном конгрессе FEBS (С.-Петербург, 2013); 10-м международном научном форуме FENS (Копенгаген, Дания, 2016); Международной конференции по никотиновым АХР (Крит, Греция, 2017). Основные научные результаты диссертации опубликованы в 23 статьях в рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендуемых Минобрнауки РФ для опубликования результатов диссертаций, 1 монографии и 3 патентах.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 730 наименований. Работа изложена на 244 страницах и содержит 55 рисунков и 11 таблиц.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### **1 Комбинаторный подход для определения клеточно-тканевой экспрессии и количественных характеристик функциональной активности Cys-петельных рецепторов**

Трехпетельные змеиные  $\alpha$ -нейротоксины короткого (60–62 а.о., 4 дисульфидные связи) и длинного (66–75 а.о., 5 дисульфидных связей) типа являются классическими высокоаффинными конкурентными антагонистами мышечного,  $\alpha 7^*$  и  $\alpha 9^*$  nAChR<sup>1</sup>, а также, как было продемонстрировано в настоящей работе, определенных подтипов ГАМК<sub>A</sub>-рецептора. В представленной работе при изучении экспрессии и свойств Cys-петельных рецепторов наиболее продуктивным оказался комбинаторный подход, сочетающий флуоресцентный и радиолигандный анализ с применением природных и модифицированных  $\alpha$ -нейротоксинов, а также кальциевый имиджинг и электрофизиологию. Конкурентный радиолигандный анализ с использованием йодированного  $\alpha$ -бунгаротоксина ( $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{Bgt}$ , *Bungarus multicinctus*) является наиболее чувствительным методом при определении количественных характеристик связывания

---

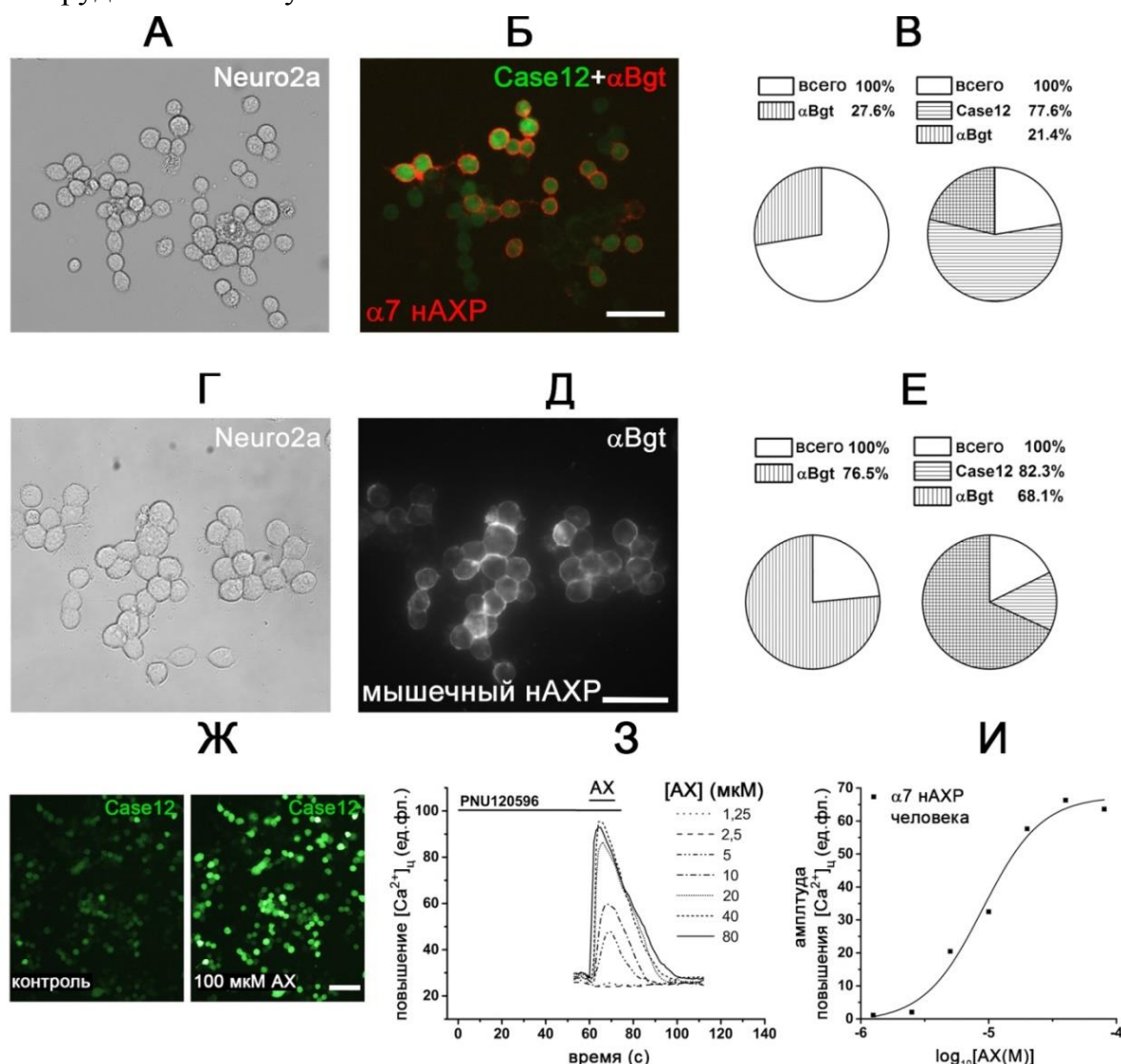
<sup>1</sup> \* - пентамер nAChR может содержать дополнительные субъединицы

лигандов с Cys-петельными рецепторами (например, глава 7.1, Рис. 18Б, Табл. 2). Его удачно дополнила аналогичная модификация флуоресцентного анализа, отличающаяся более высокой производительностью и вариативностью за счет разнообразия используемых модифицированных  $\alpha$ -нейротоксинов: флуоресцентные (Alexa Fluor 488- $\alpha$ Bgt, Alexa Fluor 555- $\alpha$ Bgt, Alexa Fluor 546-СТХ ( $\alpha$ -кобротоксин, *Naja kaouthia*), FITC-СТХ, СТХ-наноточки) и широких приборных возможностей (например, глава 2, Рис. 3 и 6). Наиболее полно потенциал флуоресцентного анализа раскрылся при определении клеточно-тканевой локализации nAHR. Так, с использованием флуоресцентных и биотинилированных  $\alpha$ -нейротоксинов успешно проводилась визуализация гетерологически экспрессированных (клетки Neuro2a, НЕК293 и GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub>, Рис. 1А – Е, 3А – Г, 6) и эндогенных (нейрональные культуры и ткани животных, Рис. 11Е – 3, 15Б2)  $\alpha 7$  и мышечного nAHR. В настоящей работе впервые был разработан гистохимический протокол для идентификации  $\alpha 7$  и мышечного nAHR на основе комбинации флуоресцентно-меченых и природных  $\alpha$ -нейротоксинов (Рис. 11Е – 3, 15Б2), специфичность которого была доказана с использованием тканей нокаутных мышечей. Радиолигандный анализ оказался незаменим при количественной оценке уровня экспрессии nAHR в клетках и тканях животных (глава 6.2, Рис. 17). Спектр молекулярных мишеней, исследуемых методами радиолигандного и флуоресцентного анализа, существенно расширялся при использовании дополнительных специфических лигандов нейрорецепторов ( $\alpha$ -коботоксинов, низкомолекулярных веществ).

Анализ функциональной активности лиганд-управляемых ионных каналов немыслим без применения электрофизиологии. В представленной работе этим методом были проанализированы функциональные характеристики как природных (Рис. 10, 16Б – Д), так и гетерологически экспрессированных Cys-петельных рецепторов (Рис. 4, 5А, 7Б – Г, 8, 22В – Д, Табл. 2). Сравнение данных, полученных методами радиолигандного или флуоресцентного анализа, с результатами электрофизиологических измерений позволяло в полной мере охарактеризовать механизм и количественные характеристики лиганд-рецепторного взаимодействия (например, глава 2, Рис. 3, 4 и 5), а также провести типирование nAHR, опосредующих определенные физиологические процессы (например, глава 6.1, Рис. 15 и 16). Добавление в уже имеющуюся триаду метода кальциевого имиджинга сделало разработанный комплексный подход наиболее полным и эффективным как для изучения активности новых соединений (главы 3, 7), так и для выяснения функциональной роли nAHR в организме (глава 4).

В настоящей работе впервые был разработан вариант кальциевого имиджинга активности гетерологически экспрессированных  $\alpha 7$  и мышечного  $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$  nAHR с применением одноволнового белкового кальциевого сенсора. Основными преимуществами этого подхода в сравнении с существующими методиками являются простота протокола, 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.

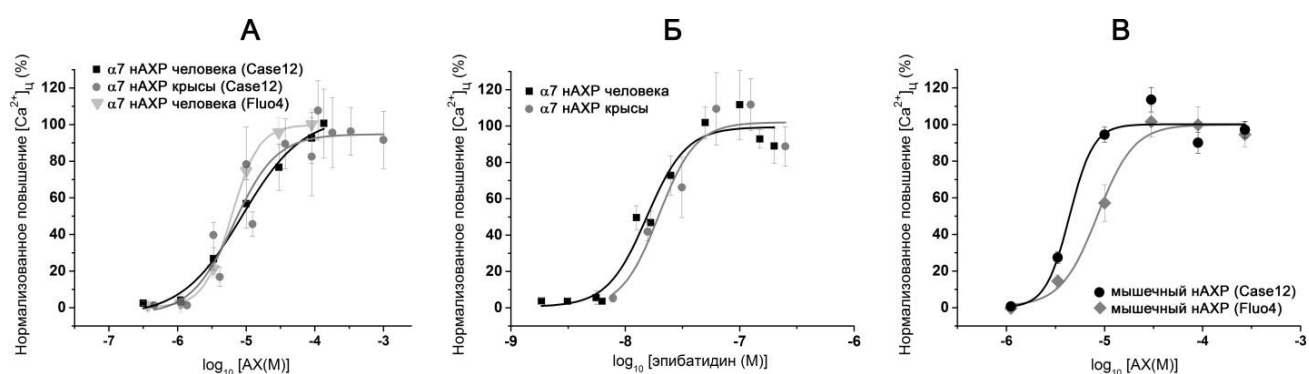


**Рис. 1 – Разработка кальциевого имиджинга активности  $\alpha 7$  и мышечного НАХР человека с применением одноволнового белкового сенсора ионов кальция.** Цитохимическое обнаружение (А, Б)  $\alpha 7$  и (Г, Д) мышечного  $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$  НАХР при совместной экспрессии с флуоресцентным белковым сенсором Case12 в клетках Neuro2a (50 нМ Alexa Fluor 555- $\alpha$ Bgt ( $\alpha$ Bgt), масштаб: 50 мкм). Диаграммы эффективности экспрессии (В)  $\alpha 7$  и (Е) мышечного  $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$  НАХР в клетках Neuro2a (окраска  $\alpha$ Bgt) в отсутствие и в присутствии Case12. Репрезентативные (Ж) микроскопические изображения (масштаб: 100 мкм) и (З) графики возрастания внутриклеточной концентрации ионов кальция ( $[Ca^{2+}]_i$ ) в клетках Neuro2a, экспрессирующих  $\alpha 7$  НАХР человека и Case12, в ответ на добавление АХ. (И) Соответствующая кривая дозозависимости амплитуды возрастания  $[Ca^{2+}]_i$ . Измерения проводили после преинкубации клеток с 10 мкМ PNU120596.

Используемая клеточная система состояла из клеток нейробластомы мыши Neuro2a, временно трансфицированных плазмидами, кодирующими субъединицы  $\alpha 7$  НАХР (Рис. 1А, Б) или мышечного  $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$  НАХР (Рис. 1Г, Д) и флуоресцентный одноволновой белковый кальциевый сенсор Case12 (491/516 нм). Введение



дополнительной плазмиды с геном Case12 не только не снижало эффективности экспрессии  $\alpha 7$  (Рис. 1В) и мышечного (Рис. 1Е) nAХР, что было показано по связыванию флуоресцентно-меченого  $\alpha$ Vgt с рецепторами на поверхности клеток, но позволяло напрямую оценивать эффективность трансфекции и жизнеспособность клеток. Так, Case12 экспрессировался в 77,6 – 82,3% клеток (Рис. 1В, Е), что хорошо коррелировало со средним числом клеток (73,5%), реагирующих на добавление ацетилхолина (АХ) резким повышением внутриклеточной концентрации ионов кальция ( $[Ca^{2+}]_c$ ) за счет активации  $\alpha 7$  nAХР (Рис. 1Ж, З). Нетрансфицированные клетки не реагировали на добавление агонистов АХР, ответ же трансфицированных клеток полностью подавлялся при преинкубации с антагонистом СТХ. На основе дозозависимости амплитуд клеточных ответов определялась аффинность  $\alpha 7$  (Рис. 1И, 7А, Б) и мышечного (Рис. 2В) nAХР к агонистам.



**Рис. 2 – Кривые дозозависимости амплитуды возрастания  $[Ca^{2+}]_c$  в клетках Neuro2a, экспрессирующих (А, Б)  $\alpha 7$  nAХР и (В) мышечный nAХР, в ответ на добавление агонистов. Регистрацию изменений  $[Ca^{2+}]_c$  проводили с использованием (А – В) белкового (Case12) и (А, В) низкомолекулярного (Fluo-4) сенсоров. (А, Б) Измерения проводили после преинкубации клеток с 10 мкМ PNU120596. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего, n = 4.**

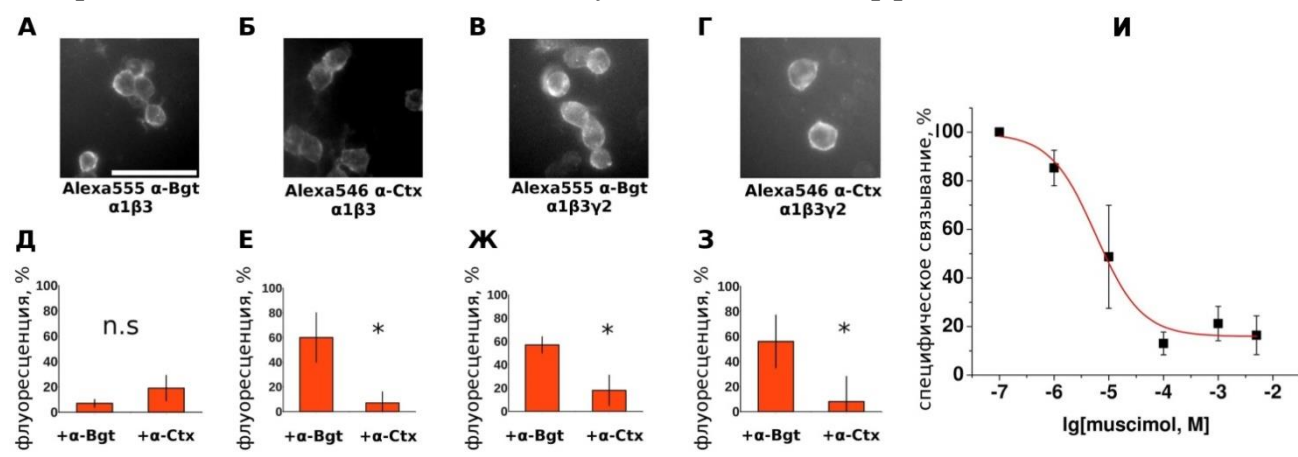
Кальциевый имиджинг активности  $\alpha 7$  и мышечного nAХР был разработан в двух модификациях: регистрация ответов отдельных клеток (Рис. 1Ж – И) и клеточных популяций (Рис. 2) с использованием флуоресцентного микроскопа и микропланшетного флуориметра, соответственно. Параметр  $EC_{50}$  (АХ)  $\alpha 7$  nAХР человека, определенный обоими методами, хорошо согласовывался (8,17 мкМ (Рис. 1И) и 8,69 мкМ (Рис. 2А), соответственно) и коррелировал с данными, полученными при использовании стандартного низкомолекулярного кальциевого индикатора Fluo-4 (6,12 мкМ, Рис. 2А), и электрофизиологическими измерениями (19 мкМ). Также в обеих модификациях кальциевого имиджинга  $\alpha 7$  nAХР человека и крысы практически одинаково реагировали на добавление агонистов (Рис. 2А, Б). Стоит отметить, что для снижения скорости десенситизации  $\alpha 7$  (но не мышечного  $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ ) nAХР и повышения амплитуды клеточных ответов при проведении кальциевого имиджинга и пэтч-кламп был применен специфический положительный модулятор PNU120596 (Рис. 1Ж – И, Рис. 2А, Б). Данный модулятор взаимодействует с обособленным трансмембранным

аллостерическим участком связывания  $\alpha 7$  nAХР, не препятствуя реакциям агонистов и конкурентных антагонистов с ортостерическим сайтом рецептора.

Таким образом, в ходе проведения диссертационной работы для изучения функционирования Cys-петельных рецепторов на молекулярном, клеточно-тканевом и организменном уровнях, а также для характеристики их новых лигандов был разработан и апробирован комплексный подход, представляющий собой сочетание флуоресцентного и радиолигандного анализа с использованием  $\alpha$ -нейротоксинов змей, а также метода кальциевого имиджинга и электрофизиологии.

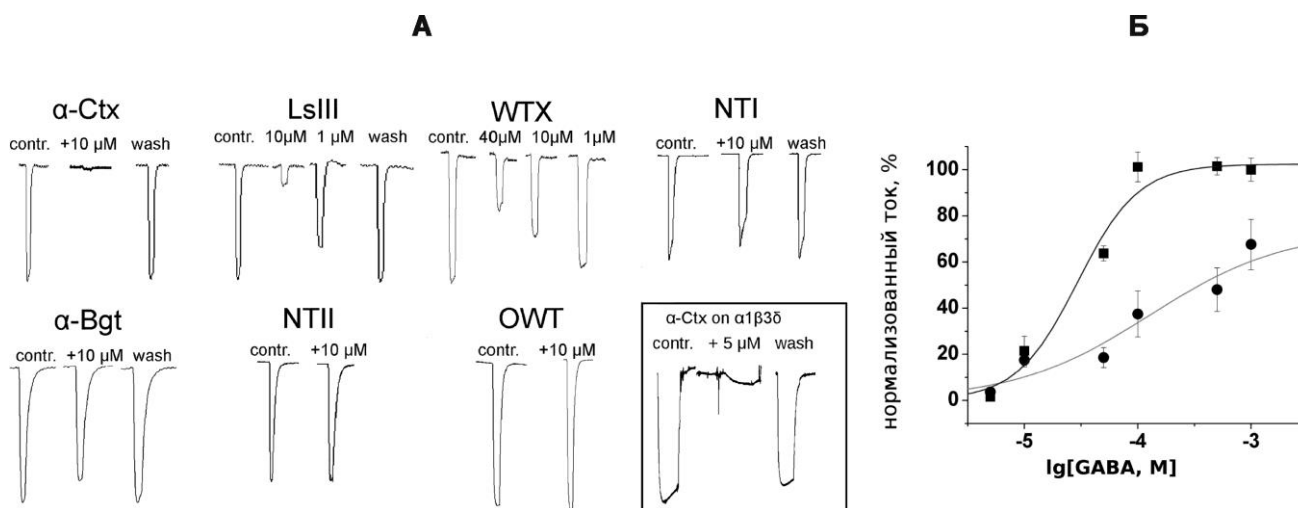
## 2 Различия в специфичности, аффинности и механизме связывания трехпетельных $\alpha$ -нейротоксинов с разными Cys-петельными рецепторами и их моделями

$\alpha$ -Нейротоксины длинного типа  $\alpha$ -бунгаротоксин ( $\alpha$ Bgt) и  $\alpha$ -кобротоксин (СТХ) являются полными аналогами как в структурном, так и в функциональном плане в отношении их классических мишеней: мышечного,  $\alpha 7^*$  и  $\alpha 9^*$  nAХР. Единственное указание на их возможное сродство к другим представителям Cys-петельных рецепторов содержалось в исследовании связывания  $\alpha$ Bgt с неприродными  $\beta 3$  и  $\alpha 1\beta 3$  ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами. В настоящей работе впервые было исследовано сродство  $\alpha$ Bgt и СТХ к природному нейрональному  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$  ГАМК<sub>A</sub>-рецептору (Рис. 3А – 3). Оба  $\alpha$ -нейротоксина связывались с гетерологически экспрессированными  $\alpha 1\beta 3$  и  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$  ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами, но СТХ существенно превосходил по аффинности  $\alpha$ Bgt, который в отношении nAХР является чуть более высокоаффинным антагонистом.



**Рис. 3 – Различная эффективность связывания  $\alpha$ Bgt и СТХ с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами.** Цитохимическое окрашивание клеток Neuro2a, экспрессирующих (А, Б)  $\alpha 1\beta 3$  и (В, Г)  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$  ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы, с помощью 50 нМ флуоресцентных  $\alpha$ Bgt и СТХ. Масштаб: 50 мкм. (Д – З) Диаграммы эффективности блокирования нативными токсинами (5 мкМ  $\alpha$ Bgt и СТХ) связывания их флуоресцентно-меченых аналогов с клеточной поверхностью. Представлены среднее  $\pm$  95% доверительный интервал, \* $p < 0,05$ ,  $n = 3$ . (И) Кривая ингибирования связывания Alexa Fluor 546-СТХ с  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$  ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами с помощью агониста мусцимола. Нормализованные данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего,  $n = 3$ .

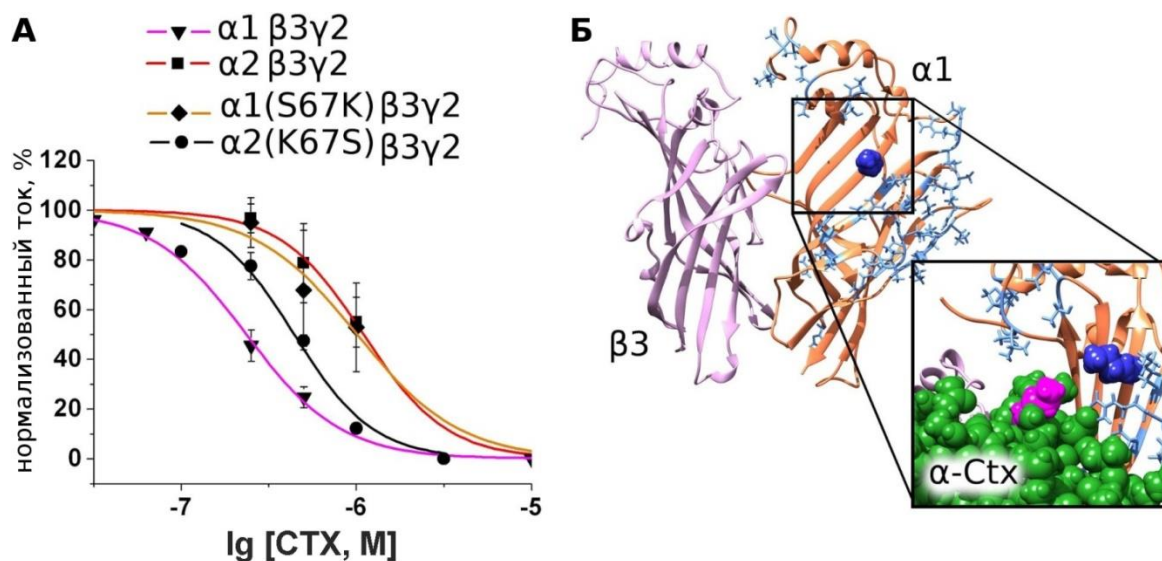
С НАХР связывание  $\alpha$ -нейротоксинов длинного типа происходит по конкурентному механизму в ортостерическом сайте связывания. Аналогично СТХ взаимодействует с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами, что было подтверждено по вытеснению флуоресцентно-меченного СТХ агонистом мусцимолем (IC<sub>50</sub> = 15 мкМ), сайт связывания которого находится в ортостерическом участке в области контакта  $\beta$  и  $\alpha$  субъединиц (Рис. 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 подавлял, что может свидетельствовать о наличии дополнительного неконкурентного участка связывания.



**Рис. 4 – Ингибирующее действие трехпетельных токсинов из ядов змей на ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы. (А)** Примеры ингибирования  $\alpha$ -нейротоксинами ионных токов в ооцитах *X. laevis*, вызванных активацией  $\alpha$ 1 $\beta$ 3 $\gamma$ 2 (или  $\alpha$ 1 $\beta$ 3 $\delta$  (врезка)) ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов с помощью 10 мкМ ГАМК (~EC<sub>50</sub>). **(Б)** Кривые дозозависимой активации ионных токов в  $\alpha$ 1 $\beta$ 3 $\gamma$ 2 ГАМК<sub>A</sub>-рецепторе с использованием разных концентраций ГАМК в контрольных условиях (квадраты) и в присутствии 250 нМ СТХ (круги). Представлены среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего, n = 3 – 5.

В электрофизиологических экспериментах СТХ оказался наиболее эффективным ингибитором  $\alpha$ 1 $\beta$ 3 $\gamma$ 2 ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов в сравнении с рядом  $\alpha$ -нейротоксинов змей, различных в структурном и фармакологическом плане: длинных ( $\alpha$ Bgt, LsIII (*Laticauda semifasciata*), NTI (*Naja oxiana*)), коротких (NTII (*N.oxiana*)) и «необычных» (WTX (*N.kaouthia*), OWT (*N.oxiana*)) (Рис. 4А). Также СТХ (5 мкМ) полностью блокировал активность другого природного нейронального  $\alpha$ 1 $\beta$ 3 $\delta$  ГАМК<sub>A</sub>-рецептора (Рис. 4А, врезка). В присутствии СТХ (250 нМ) параметр EC<sub>50</sub> (ГАМК)  $\alpha$ 1 $\beta$ 3 $\gamma$ 2 ГАМК<sub>A</sub>-рецептора изменялся с 29 до 128 мкМ, а соответствующая кривая не достигала насыщения при высоких концентрациях агониста и напоминала двухсайттовую (Рис. 4Б). Такая форма кривой, вероятно, 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 дополнительного неконкурентного механизма ингибирования ГАМК<sub>A</sub>-рецептора токсином.



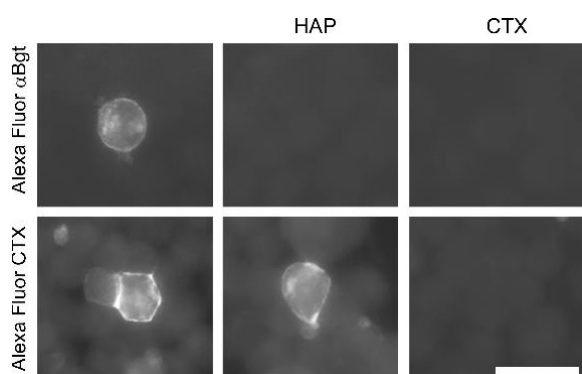
**Рис. 5** – Влияние аминокислотной замены в 67 положении в ортостерическом лиганд-связывающем участке ГАМК<sub>A</sub>-рецептора на связывание СТХ. (А) Кривые ингибирования СТХ ионных токов в ооцитах *X. laevis*, вызванных активацией ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов при добавлении 10 мкМ ГАМК (~ EC<sub>50</sub>). Представлены среднее ± стандартная ошибка среднего, n = 3. (Б) Показаны внеклеточные домены субъединиц  $\beta 3/\alpha 1$ , образующие лиганд-связывающий участок. Аминокислотные остатки, которые различаются в  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  субъединицах, отмечены голубым цветом, Ser-67 показан темно-синим цветом. Согласно молекулярному моделированию при замене S67K этот остаток практически соприкасается с лизином (пурпурный цвет) петли II СТХ (врезка).

СТХ проявлял избирательность по отношению к определенным подтипам ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов. Так, при ингибировании ГАМК(10 мкМ)-индуцированных токов его аффинность к  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$  рецептору оказалась почти в пять раз выше (IC<sub>50</sub> = 236 мкМ), чем к  $\alpha 2\beta 3\gamma 2$  подтипу (IC<sub>50</sub> = 1099 мкМ) (Рис. 5А). Принимая во внимание важную роль положительного заряда центральной петли СТХ в связывании с nAХР, мы предположили, что данное взаимодействие может быть решающим и в изучаемой реакции (модель на Рис. 5Б). 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,  $\alpha 1(S67K)\beta 3\gamma 2$  рецептор заметно утрачивал сродство к СТХ (Рис. 5А, Б, IC<sub>50</sub> = 703 нМ). Обратный эффект был замечен при мутации  $\alpha 2(K67S)$  (Рис. 5А, IC<sub>50</sub> = 442 нМ). Полученные данные подтверждают правильность построенной модели связывания СТХ с ГАМК<sub>A</sub>-рецептором в  $\beta 3/\alpha 1$  ортостерическом участке (Рис. 5Б).

Таким образом, впервые обнаружено ингибирование природных подтипов ГАМК<sub>A</sub>-рецептора ( $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ ,  $\alpha 2\beta 3\gamma 2$ ,  $\alpha 1\beta 3\delta$ ) трехпетельными токсинами, классическими конкурентными антагонистами nAХР. Для наиболее эффективного ингибитора (СТХ) предложена модель его связывания в ортостерическом участке ГАМК<sub>A</sub>-рецептора,

подтверждающая ключевую роль положительного заряда его петли II. Дополнительно обнаружена аллостерическая компонента связывания СТХ с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами.

Сильные различия в специфичности и аффинности  $\alpha$ Bgt и СТХ также проявились при изучении их связывания с моделями ортостерического лиганд-связывающего участка nAХР – пептидом НАР (high-affinity peptide, WRYYESSLLPYPD) и его аналогами, гомологичными фрагменту петли С мышечного и  $\alpha 7$  nAХР. В составе пептида НАР соседние консервативные С – С остатки заменены атомами серы. Уникальность НАР проявляется в высокоаффинном связывании с  $\alpha$ Bgt (2 нМ). В кристаллической структуре комплекса с  $\alpha$ Bgt пептид НАР демонстрировал конформацию, весьма сходную с петлей С ацетилхолинсвязывающего белка, эталонной структурной модели лиганд-связывающего домена nAХР. В наших опытах с применением разработанного комплексного подхода (сочетание флуоресцентного и радиолигандного анализа с электрофизиологией и кальциевым имиджингом) преинкубация  $\alpha$ Bgt с пептидом НАР и его аналогами полностью подавляла ингибирующее действие  $\alpha$ -нейротоксина на мышечный и  $\alpha 7$  nAХР, а также ГАМК<sub>A</sub>-рецептор (Рис. 6, верхний ряд). При использовании СТХ пептид НАР и его аналоги не препятствовали связыванию  $\alpha$ -нейротоксина с исследованными мишенями (Рис. 6, нижний ряд), либо в небольшой степени подавляли его действие даже при сильном молярном избытке токсина. Также какого-либо эффекта данных пептидов не было отмечено при исследовании связывания с рецепторами ряда  $\alpha$ -конотоксинов, высокоаффинных антагонистов мышечного или  $\alpha 7$  nAХР. Таким образом, трехпетельные  $\alpha$ -нейротоксины, являющиеся полными структурно-функциональными аналогами в отношении nAХР, основной мишени их действия, проявляют сильную гетерогенность в селективности, аффинности и механизме связывания с неклассическими мишенями: ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами и моделями лиганд-связывающего участка nAХР.



**Рис. 6 – Влияние пептида НАР на связывание  $\alpha$ Bgt и СТХ с ГАМК<sub>A</sub>-рецептором.**

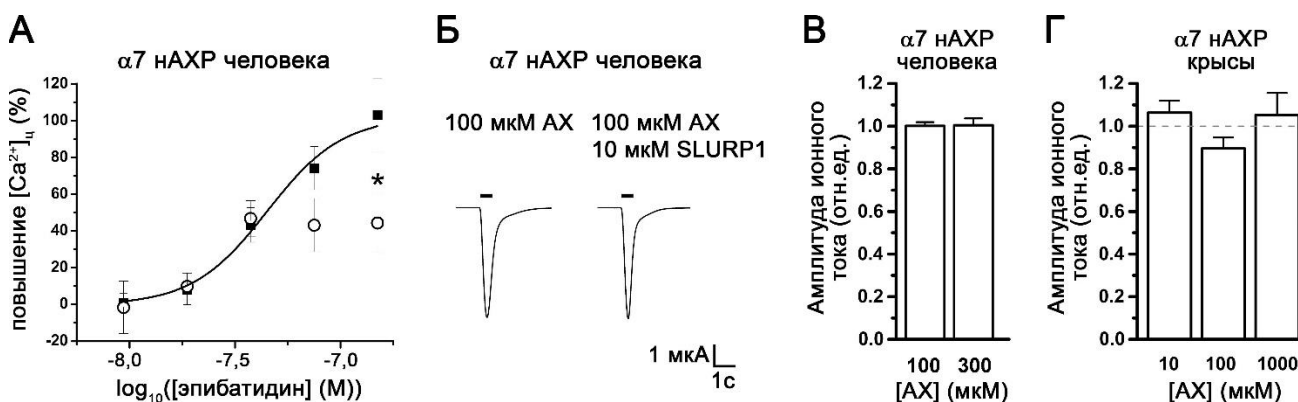
Показано связывание флуоресцентных  $\alpha$ -нейротоксинов с  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$  ГАМК<sub>A</sub>-рецептором на поверхности клеток Neuro2a (левая колонка) и его ингибирование при преинкубации токсинов с 10 мкМ НАР (средняя колонка) или клеток с 40х избытком СТХ (правая колонка). Масштаб: 25 мкм.

### **3 Определение селективности, аффинности и механизма ингибирования nAХР синтетическим трехпетельным белком SLURP-1 человека**

Структурными аналогами  $\alpha$ -нейротоксинов являются трехпетельные белки семейства Луб. Помимо сходных трехмерных структур, эти белки объединяет похожая генетическая организация и расположение остатков цистеина, которые образуют

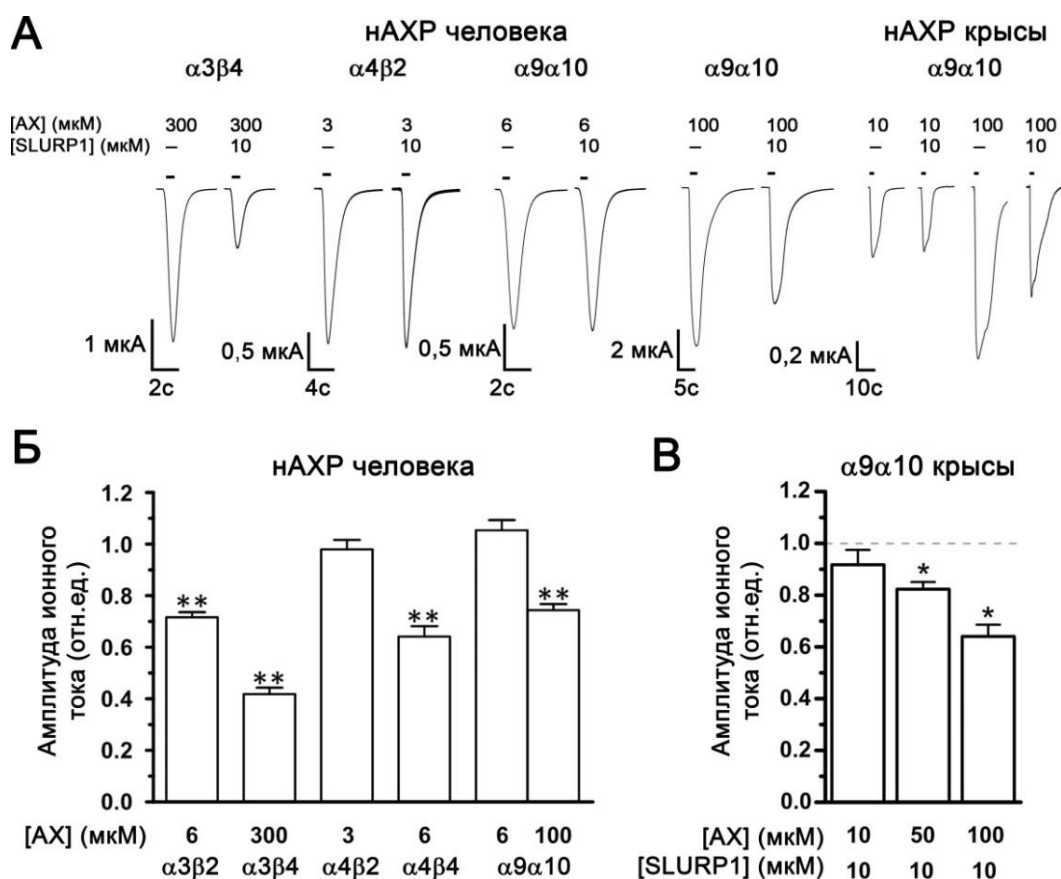
стабилизирующие структуру дисульфиды. Одним из секретируемых представителей данных белков является SLURP1 (secreted Ly6/urokinase-type plasminogen receptor-related protein, 81 а.о., 5 дисульфидных связей), первоначально выделенный из пептидных библиотек крови и мочи человека, а затем найденный в кератиноцитах, где его мутации являются причиной развития наследственной кератодермии, болезни острова Меледа. Также SLURP1 принимает участие в ряде клеточных регуляторных механизмов в нервной и иммунной системах организма. В связи с существенными различиями в опубликованных активностях рекомбинантных форм SLURP-1 в отношении nAHP (в основном гомопентамерного  $\alpha 7$  подтипа) механизм его действия остается неоднозначным.

В настоящей работе впервые тестировался химически синтезированный SLURP1 человека. Он не конкурировал с [ $^{125}$ I]- $\alpha$ Bgt за связывание с  $\alpha 7$  и мышечным nAHP и модельными ацетилхолинсвязывающими белками. В связи с этим были получены его флуоресцентные аналоги (FITC-SLURP1, Alexa Fluor 546-SLURP1), но достоверного взаимодействия конъюгатов с модельными белками и полноразмерным  $\alpha 7$  nAHP выявлено не было. Кальциевый имиджинг показал, что добавление 5 мкМ SLURP1 статистически достоверно ингибирует эписбатидин-индуцированное повышение  $[Ca^{2+}]_i$  в клетках Neuro2a, экспрессирующих  $\alpha 7$  nAHP человека (59% ингибирования при 150 нМ концентрации эписбатидина в присутствии 10 мкМ PNU120596, Рис. 7А), однако на мышечный nAHP SLURP1 не оказывал подобного эффекта. В электрофизиологических тестах 10 мкМ SLURP1 не оказывал ингибиторного действия на  $\alpha 7$  nAHP человека (Рис. 7Б, В) и крысы (Рис. 7Г).



**Рис. 7 – Эффекты синтетического белка SLURP-1 на  $\alpha 7$  nAHP.** (А) Кривые дозозависимости амплитуды повышения  $[Ca^{2+}]_i$  в клетках Neuro2a, экспрессирующих  $\alpha 7$  nAHP человека, при добавлении агониста эписбатидина в контроле (квадраты,  $EC_{50} = 44,9 \pm 4,6$  нМ) и в присутствии 5 мкМ SLURP-1 (круги). Измерения проводились в присутствии 10 мкМ PNU120596. (Б) Примеры и (В, Г) средние нормализованные амплитуды АХ-индуцированных ионных токов в  $\alpha 7$  nAHP, экспрессированных в ооцитах *X. laevis*, в контроле и в присутствии 10 мкМ SLURP-1. Приведены среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего,  $n=3-10$ ,  $*p<0,05$ , двухвыборочный  $t$ -критерий Стьюдента.

Электрофизиологический скрининг действия SLURP1 на ряд нейрональных гетеромерных nAHP человека выявил предпочтительное ингибирование рецепторов, содержащих  $\alpha 3$  и  $\beta 4$  субъединицы (Рис. 8А, Б). Так, 10 мкМ SLURP1 подавлял ионные токи, вызванные действием АХ ( $EC_{50}$ ), 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 ингибировании  $\alpha 3\beta 4$  nAHP параметр  $IC_{50}$  (SLURP-1) составил  $4,75 \pm 0,78$  мкМ. Степень ингибирования SLURP-1 (10 мкМ)  $\alpha 3\beta 4$  nAHP возрастала ( $> 80\%$ ) при использовании концентраций АХ, более низких, чем  $EC_{50}$  (30 и 100 мкМ). В совокупности эти данные могут свидетельствовать о расположении сайта связывания SLURP-1 в области контакта  $\alpha 3$  и  $\beta 4$ -субъединиц.



**Рис. 8 – Ингибирующее действие синтетического белка SLURP-1 человека на гетеромерные нейрональные nAHP.** (А) Примеры АХ-индуцированных ионных токов в  $\alpha 3\beta 4$ ,  $\alpha 4\beta 2$  и  $\alpha 9\alpha 10$  nAHP, экспрессированных в ооцитах *X. laevis*, в контроле и в присутствии 10 мкМ SLURP-1. (Б) Диаграммы SLURP-1 (10 мкМ)-опосредованного ингибирования АХ ( $EC_{50}$ )-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) и  $\alpha 9\alpha 10$  (6 мкМ) nAHP человека, (В) а также  $\alpha 9\alpha 10$  nAHP крысы ( $EC_{50}$  (АХ) = 20 мкМ). Приведены среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего,  $n = 6 - 14$ ,  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,0001$ , двухвыборочный  $t$ -критерий Стьюдента.

Ингибирующее действие SLURP1 на  $\alpha 9\alpha 10$  человека становилось заметным при повышении добавляемой концентрации АХ с 6 ( $\sim EC_{50}$ ) до 100 мкМ ( $\sim 25\%$ , Рис. 8А, Б). Аналогичная зависимость его активности от концентрации АХ прослеживалась в отношении  $\alpha 9\alpha 10$  nAHP крысы (Рис. 8В). Суммируя все результаты, полученные для  $\alpha 7$  и  $\alpha 9\alpha 10$  nAHP, можно утверждать, что SLURP1 является их негативным

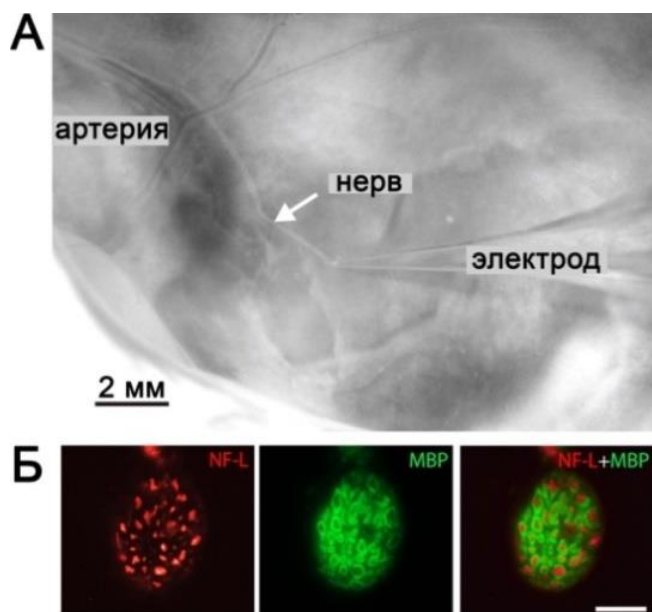
эндогенным аллостерическим модулятором, который проявляет активность в отношении рецепторов, которые находятся в стабильной открытой конформации.

Таким образом, в настоящей работе впервые было установлено, что синтетический белок SLURP-1 человека, структурный аналог трехпетельных  $\alpha$ -нейротоксинов змей, 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 nAHP SLURP-1 является аллостерическим негативным модулятором.

Разработанный комплексный подход (сочетание флуоресцентного и радиолигандного анализа с электрофизиологией и кальциевым имиджингом) был апробирован для исследования селективности, аффинности и механизма связывания пептидно-белковых лигандов Cys-петельных рецепторов, далее он был применен для изучения их физиологической и патофизиологической роли в организме.

#### 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 ноцицепции, т.к. при проведении болевого сигнала в организме затрагивается очень большое число нервных центров, начиная от ноцицептивных клеток чувствительных ганглиев и заканчивая отделами ЦНС. Это отражает и наличие 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. Проведение дальнейших исследований также обосновано необходимостью разработки новых эффективных и безопасных обезболивающих средств, которые не будут вызывать привыкания, что особенно важно при хронических болях.



**Рис. 9 – Ex vivo препарат твердой оболочки головного мозга крысы с иннервирующим ее нервом (*nervus spinosus*). (А) На микрофотографии препарата показано расположение *nervus spinosus* относительно срединной артерии оболочек мозга, а также виден подведенный микроэлектрод. (Б) Гистохимическое окрашивание миелинизированных нервных волокон на поперечном срезе *nervus spinosus* с помощью антител к легкому компоненту нейрофиламентов (NF-L, красный цвет) и к основному белку миелина (MBP, зеленый цвет). Масштаб: 20 мкм.**

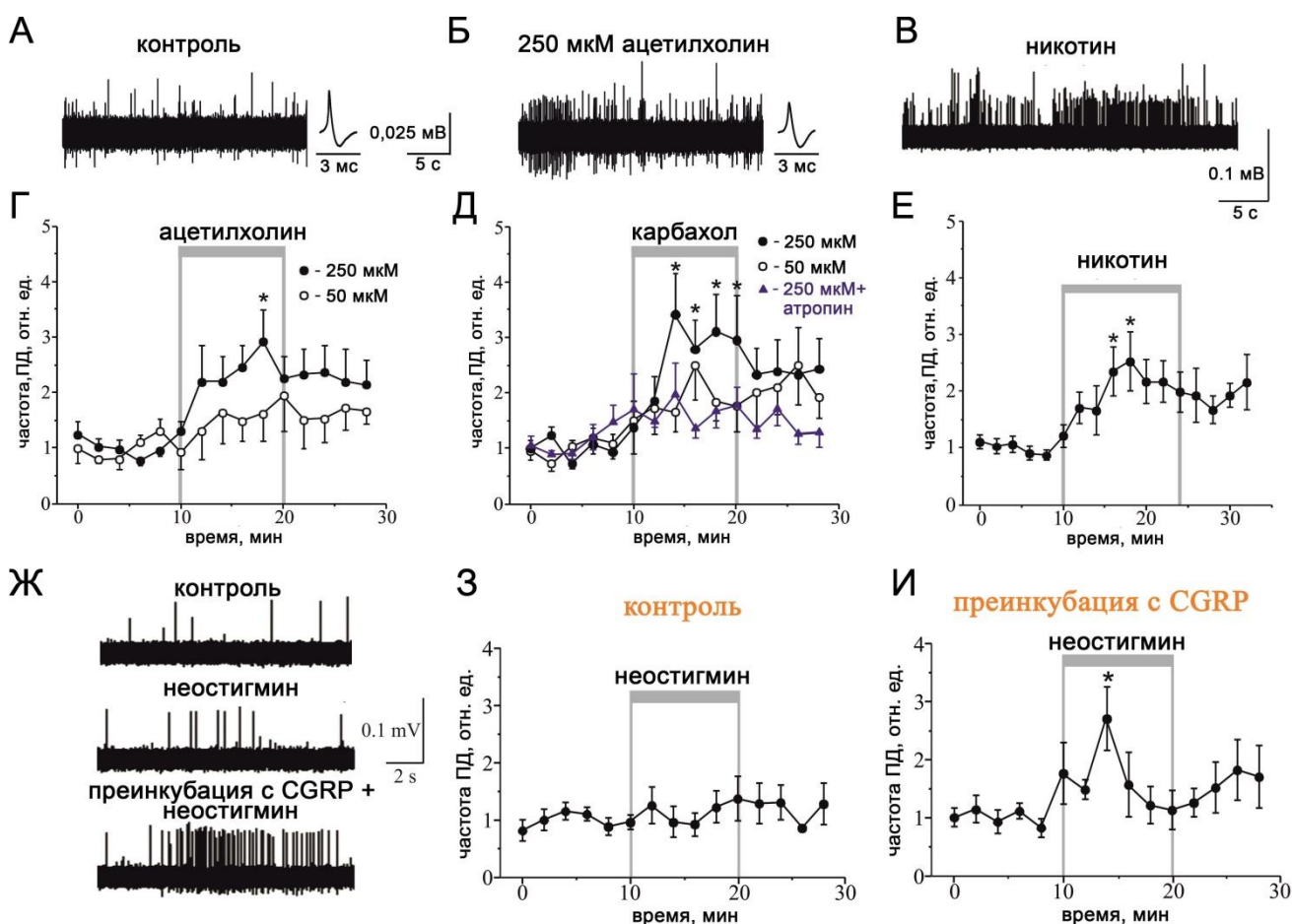


В патофизиологии мигрени внимание традиционно уделялось передаче ноцицептивной информации тройничным чувствительным нервом из оболочек головного мозга, основного места зарождения болевых сигналов, в высшие центры болевой чувствительности в головном мозге. Практически не исследованной оставалась функциональная роль иннервации данных тканей парасимпатической нервной системой, холинергической по своей природе. Однако обширный ряд данных, начиная с влияния парасимпатической нервной системы на чувствительные нервные волокна тройничного нерва и кровотоков в мозговых оболочках, а также возникновение болей, спровоцированное агонистом АХР карбамоилхолином, косвенно указывают на вероятно важную роль данной системы как в ноцицепции, так и в развитии мигрени.

В настоящей 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. 9). Для регистрации спонтанной ноцицептивной активности в препарате чувствительная ветвь тройничного нерва (*nervus spinosus*), иннервирующая твердую мозговую оболочку, была освобождена от окружающей соединительной ткани и помещена в микроэлектрод (Рис. 9А). Иммуногистохимическое окрашивание поперечных срезов этого нерва показало наличие в его составе крупных и средних миелинизированных нервных волокон типа А (Рис. 9Б, 50 – 150 волокон в нерве), а также немиелинизированных тонких аксонов типа С. Большинство обнаруженных средних и тонких нервных волокон являются ноцицептивными.

В контрольных условиях наблюдалась относительно невысокая ноцицептивная активность *nervus spinosus*, которая усиливалась при добавлении холинергических агонистов к твердой мозговой оболочке (Рис. 10). Так, ацетилхолин (АХ, 250 мкМ), эндогенный агонист нАХР и мАХР, за 10 мин добавления достоверно повышал частоту регистрируемых потенциалов действия (ПД) в среднем в 2,5 раза, его более низкая концентрация (50 мкМ) также усиливала ноцицептивную активность, но эффект был статически не достоверен (Рис. 10Б, Г). В связи с достаточно быстрым разрушением АХ в живых тканях также была проверена эффективность более стабильных холинергических агонистов: карбамоилхолина (250 мкМ, Рис. 10Д), предпочтительно активирующего мАХР, и никотина (100 мкМ, Рис. 10В, Е), специфичного в отношении нАХР. Оба агониста вызывали статистически значимое увеличение частоты ПД уже при 6 – 8 минутах применения, проявив таким образом бóльшую эффективность по сравнению с АХ. Подтверждая специфичность действия карбамоилхолина и никотина их про-ноцицептивная активность подавлялась антагонистом мАХР атропином (1 мкМ, Рис. 10Д) и ингибитором нАХР *d*-тубокурарином (50 мкМ), соответственно. Таким образом, впервые было обнаружено

проноцицептивное действие агонистов АХР (в том числе эндогенного АХ) в оболочках головного мозга, основном месте зарождения болей при мигрени.



**Рис. 10 – Про-ноцицептивное действие холинергических агонистов, оказываемое на *ex vivo* препарат твердой оболочки головного мозга крысы.** (А) Примеры спонтанной ноцицептивной электрической активности и усредненной формы потенциалов действия (ПД), регистрируемых в *nervus spinosus* в контрольных условиях и при действии (Б) 250 мкМ АХ и (В) 100 мкМ никотина. Частота ПД достоверно увеличивалась при добавлении к препарату (Г) АХ, (Д) карбамоилхолина (1 мкМ атропин отменял эффект) и (Е) никотина (100 мкМ). При добавлении 12,5 мкМ неостигмина, ингибитора ацетилхолинэстеразы, частота ПД (Ж, З) оставалась неизменной в контроле и (Ж, И) возрастала после преинкубации препарата с пептидом CGRP (1 мкМ, 2 ч). Каждая временная точка отражает среднюю нормализованную частоту ПД за 2 мин. Приведены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n = 5 - 10$ ,  $*p < 0.05$ , дисперсионный анализ для повторных измерений, тест Tukey).

Важным компонентом эндогенной холинергической нервной системы являются ферменты ацетилхолин- и бутирилхолинэстераза, обеспечивающие метаболизм АХ. В настоящей работе было продемонстрировано их наличие в нервных волокнах твердой мозговой оболочки, окружающих кровеносные сосуды, а также в более редких случаях в отдельных аксонах, расположенных диффузно. Среди иммунопозитивных волокон встречались как тонкие немиелинизированные, так и большие по диаметру миелинизированные аксоны. Применение классического ингибитора холинэстеразной активности неостигмина (12,5 мкМ) позволило подтвердить функциональную

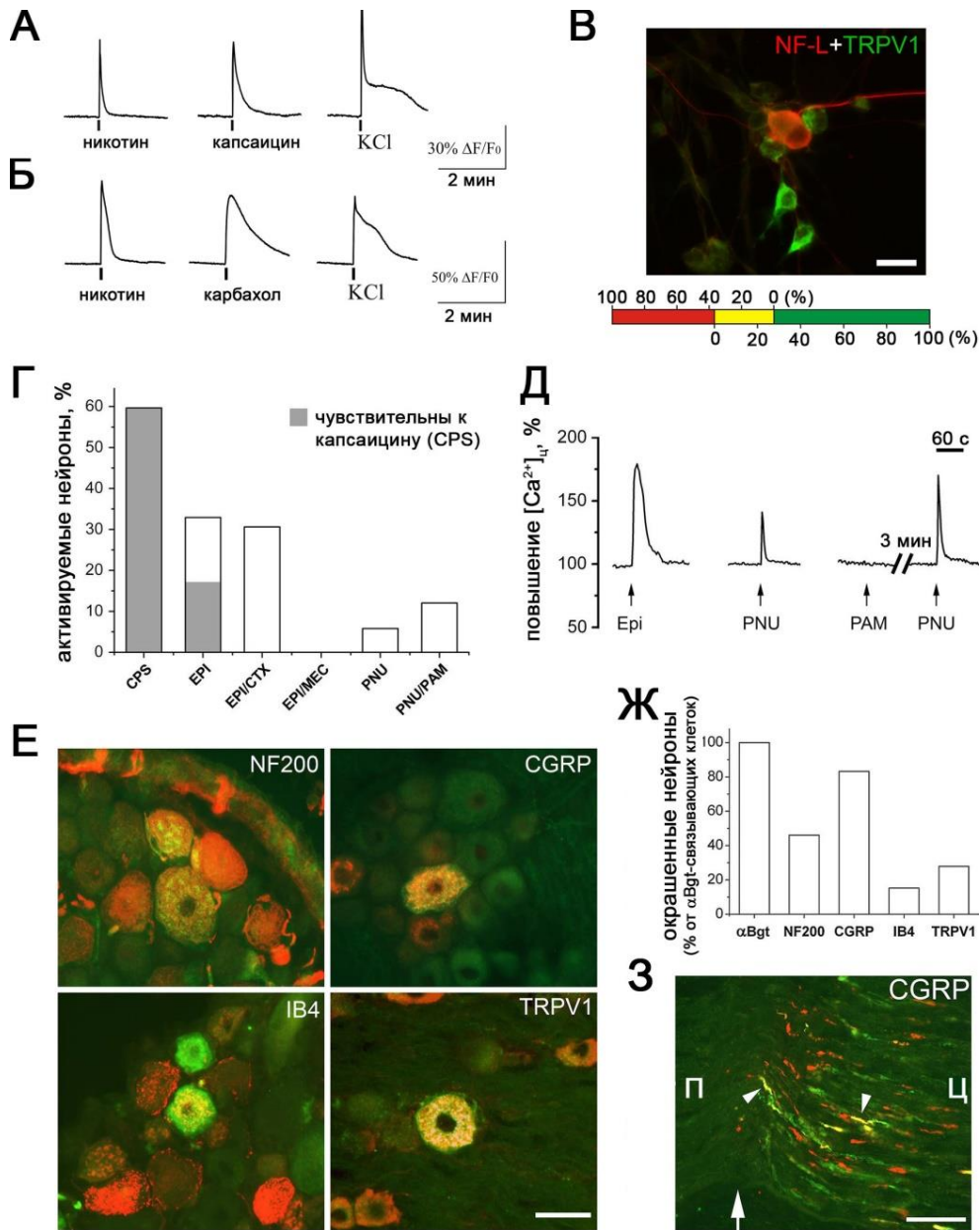
активность обнаруженных ферментов и участие выделяющегося эндогенного АХ в регуляции ноцицептивной активности в мозговых оболочках (Рис. 10Ж – И). В контрольных условиях этот блокатор не оказывал влияния на спонтанную ноцицептивную электрическую активность *nervus spinosus* (Рис. 10Ж, З). Однако он вызывал 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. 10Ж, И). Наблюдаемый эффект эндогенного АХ подавлялся антагонистом нАХР *d*-тубокурарином (50 мкМ). Таким образом, впервые установлено, что в условиях экспериментальной модели мигрени, вызванных преинкубацией *ex vivo* препарата твердой мозговой оболочки с пептидом CGRP, эндогенный АХ способен оказывать проноцицептивное действие, что может указывать на важность холинергической нервной передачи при данной патологии.

На следующем этапе работы были изучены клеточные и молекулярные мишени действия АХ в мозговых оболочках. Полученные электрофизиологические данные позволяют полагать, что агонисты АХР в мозговых оболочках могут непосредственно воздействовать на нервные окончания ноцицептивных афферентных нейронов, что было ранее показано для кожи и эпителия носовой полости. 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. Первые отличаются небольшим диаметром тел и аксонов, которые чаще не миелинизированы (тип С) или слабо миелинизированы (тип Ад), 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.

Методами кальциевого имиджинга и цито-/гистохимии с использованием приведенной нейрональной классификации нами была обнаружена функциональная экспрессия ряда нАХР и мАХР афферентными нейронами тройничного и спинномозговых сенсорных ганглиев, аккумулирующих информацию из мозговых оболочек и других периферических органов, соответственно (Рис. 11). Так, 43% и 71% нейронов тройничного ганглия экспрессировали функциональные нАХР и мАХР, т.к. были чувствительны к никотину и карбамоилхолину, соответственно (Рис. 11А, Б). Причем большинство этих клеток (70% из всех карбамоилхолин-позитивных) реагировали на оба холинергических агониста (Рис. 11Б). Среди нейронов спинномозговых ганглиев крыс 33% экспрессировали функциональные нАХР, демонстрируя выраженный клеточный ответ на добавление агониста эпibatидина,

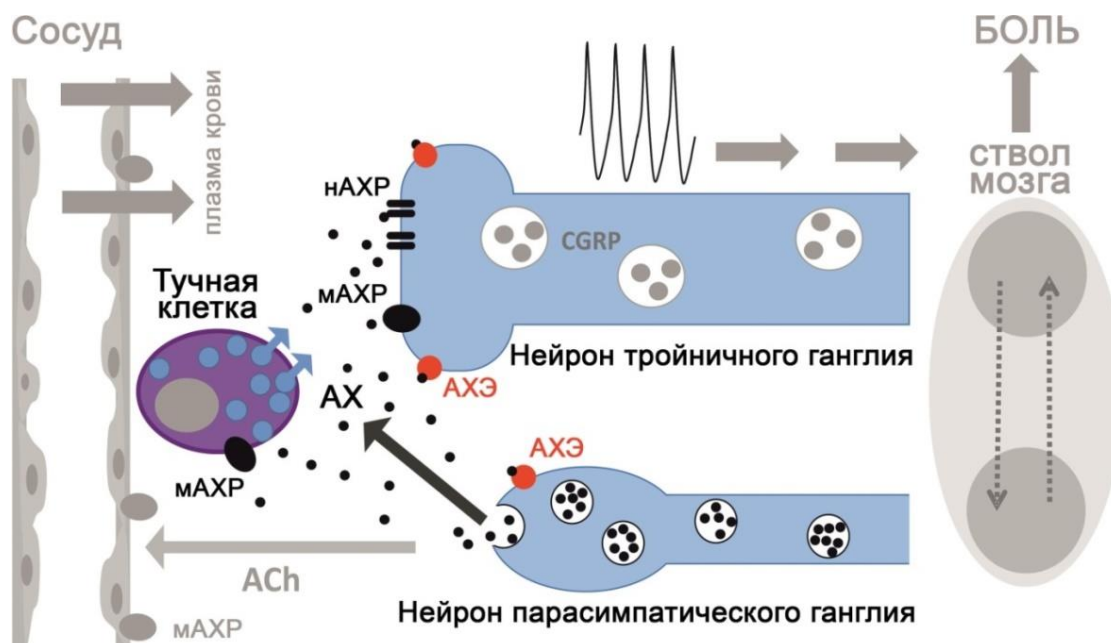
который полностью блокировался антагонистом нАХР мекамиламином (Рис. 11Г, Д). Значительная часть афферентных нейронов, экспрессирующих АХР (31% в тройничном ганглии и 55% в спинномозговых ганглиях), оказались ноцицептивными, т.к. проявляли активность в ответ на воздействие капсаицина (Рис. 11А, Г). Таким образом, установлено, что ансамбль холинорецепторов, экспрессируемых определенным афферентным нейроном, довольно сложный. В большинстве случаев представлены как мАХР, так и нАХР и последние в свою очередь составлены из гомо- и гетеропентамерных рецепторов. Об этом свидетельствует блокирование эпibatидин-индуцированных ответов при действии  $\alpha 7$  нАХР-селективного антагониста СТХ только в 2,4% нейронов, хотя специфический агонист PNU282987 вызывал активацию  $\alpha 7$  нАХР в 5,8 – 12% клеток (Рис. 11Г, Д). Стоит также отметить, что амплитуда и длительность эпibatидин-индуцированных ответов значительно варьировали и превышали типичные кратковременные реакции  $\alpha 7$  нАХР (Рис. 11Д), что указывает на вовлеченность различных подтипов гетеропентамерных нАХР. Гомопентамерные  $\alpha 7$  нАХР экспрессировались в основном ноцицептивными нейронами: 77% PNU282987-чувствительных нейронов реагировали на добавление капсаицина (Рис. 11Г, Д), 83%  $\alpha$ Bgt-связывающих клеток окрашивались антителами к нейропептиду CGRP, т.е. были пептидергическими ноцицепторами, а 15% связывали изолектин В4, маркер непептидергических ноцицепторов (Рис. 11Е, Ж). Также был показан совместный аксональный транспорт первичными афферентными нейронами пептида CGRP с  $\alpha 7$  нАХР (Рис. 11З). Таким образом, впервые показана предпочтительная экспрессия (83% клеток) и аксональный транспорт функционально-активных  $\alpha 7$  нАХР ноцицептивными афферентными нейронами, выделяющими нейропептид CGRP, известный нейротрансмиттер и провоспалительный агент, основной медиатор болей при мигрени.

В наших *ex vivo* и *in vitro* экспериментах агонисты нАХР не провоцировали выделение CGRP ноцицептивными нейронами напрямую и не влияли на капсаицин-индуцированный выброс этого нейропептида. Полученные данные подтвердили, что для подобного действия холинергических агонистов, наблюдаемого в ряде тканей организма, нужна активация посредника, например, симпатических нервных волокон или иммунных клеток. Известно, что дегрануляция тучных клеток оболочек мозга приводит к выделению набора провоспалительных и проноцицептивных агентов, длительной активации ноцицепторов и продолжительной головной боли. В нашем исследовании впервые было показано, что карбамоилхолин (50 мкМ) провоцировал дегрануляцию в 62% тучных клеток твердой оболочки мозга крыс, что значительно превышало контрольные значения. Никотин (100 мкМ) же не вызывал подобного эффекта, что свидетельствует о действии карбамоилхолина, опосредованном активацией мАХР тучных клеток.



**Рис. 11** – Функциональная экспрессия nAHR и mAHR первичными афферентными нейронами (А-В) тройничного и (Г-З) спинномозговых ганглиев крысы. (А, Б) Примеры повышения  $[Ca^{2+}]_i$  в нейронах при последовательном добавлении 100 мкМ никотина, 50 мкМ карбамоилхолина, 200 нМ капсаицина, 50 мМ КСl. (В) Окрашивание нейронов тройничного ганглия антителами к рецептору TRPV1 (зеленый цвет) и нейрофиламентам (NF-L, красный цвет). Масштаб: 20 мкм. (Г, Д) Повышение  $[Ca^{2+}]_i$  в нейронах при добавлении агонистов nAHR эпibatидина (EPI, 10 мкМ) и PNU282987 (PNU, 1 мкМ). Модулятор PNU120596 (PAM, 1 мкМ) усиливал эффект PNU282987. Антагонисты nAHR (мекамиламин, MES, 100 мкМ и STX (1 мкМ)) ингибировали эффекты. (Е) Двойное гистохимическое окрашивание срезов спинномозговых ганглиев с помощью Alexa Fluor 488- $\alpha$ Bgt (зеленый цвет) и антител (красный цвет) к нейрофиламентам (NF200), нейропептиду CGRP и TRPV1, а также связывание изолектина (IB4, красный цвет). (Ж) Гистограмма отражает процент нейронов, связывающих  $\alpha$ Bgt и иммуноположительных к нейрохимическим маркерам. (З) Совместный аксональный транспорт  $\alpha 7$  nAHR (зеленый цвет) и нейропептида CGRP (красный цвет) в спинномозговом нерве (желтый цвет, острие стрелок). Место пережатия нерва показано вертикальной стрелкой. Масштаб: 40 мкм.

Схематическое изображение на рисунке 12 суммирует полученные в этом исследовании результаты, а также включает некоторые литературные данные о роли парасимпатических нервов в мозговых оболочках.



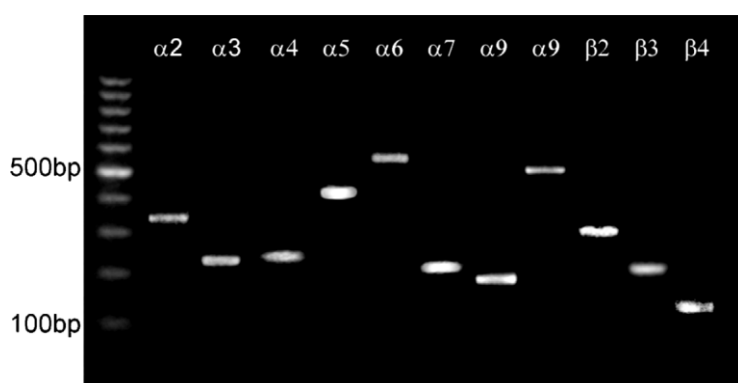
**Рис. 12 – Схематическое изображение роли холинергической нервной передачи при ноцицепции в оболочках головного мозга.** Оболочки головного мозга иннервируются чувствительной ветвью тройничного нерва (*nervus spinosus*) и постганглионарными парасимпатическими нервными волокнами. АХ, выделяемый этими волокнами, может активировать тучные клетки через мАХР и ноцицептивные нервные окончания, действуя на нАХР и мАХР. Такая согласованная активация АХР приводит к усилению ноцицептивной нервной передачи в *nervus spinosus*. Время жизни АХ ограничено благодаря активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ), которая расщепляет избыток этого нейромедиатора. Кроме того, АХ может приводить к расширению небольших сосудов в оболочках мозга и выходу плазмы крови в окружающие ткани, действуя через мАХР. На уровне ствола головного мозга обе нервные 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.

## 5 Функциональная активность нАХР в организме. Воспаление

Воспалительные процессы в той или иной степени вовлечены в патогенез практически любого заболевания и зачастую тесно взаимосвязаны с нейрональной сигнализацией. В последние годы очень популярны исследования функционирования «не-нейрональных» нАХР в клетках иммунной системы, эпителия, эндотелия и др. Особенное внимание привлекла недавно открытая ключевая роль  $\alpha 7$  нАХР макрофагов и подобных им иммунных клеток в «холинергическом противовоспалительном

рефлексе», объединяющем иммунные процессы и их контроль со стороны нервной системы. В представленной работе основным объектом исследования стали нейтрофилы самцов мышей из очага воспалительной реакции, для которых роль нАХР изучена в недостаточной мере. Так, не проведено типирование нАХР, экспрессируемых нейтрофилами и участвующих в их защитных реакциях. Нейтрофилы принимают участие в реакциях врожденного и адаптивного иммунитета, обладают мощным бактерицидным и фунгицидным действием, вырабатывают цитокины и другие биологически активные молекулы, а также активные формы кислорода. Среди клеток врожденного иммунитета они являются самыми быстрыми и мощными эффекторами острой фазы воспаления. Чрезвычайно важна регуляция их активности для предотвращения развития неконтролируемой воспалительной реакции.

В настоящей работе впервые определены подтипы нАХР, активация которых способствует выработке нейтрофилами активных форм кислорода и усиливает их клеточную адгезию. 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. 13), которые могут комбинироваться, создавая широкий спектр подтипов нАХР на поверхности клеток.

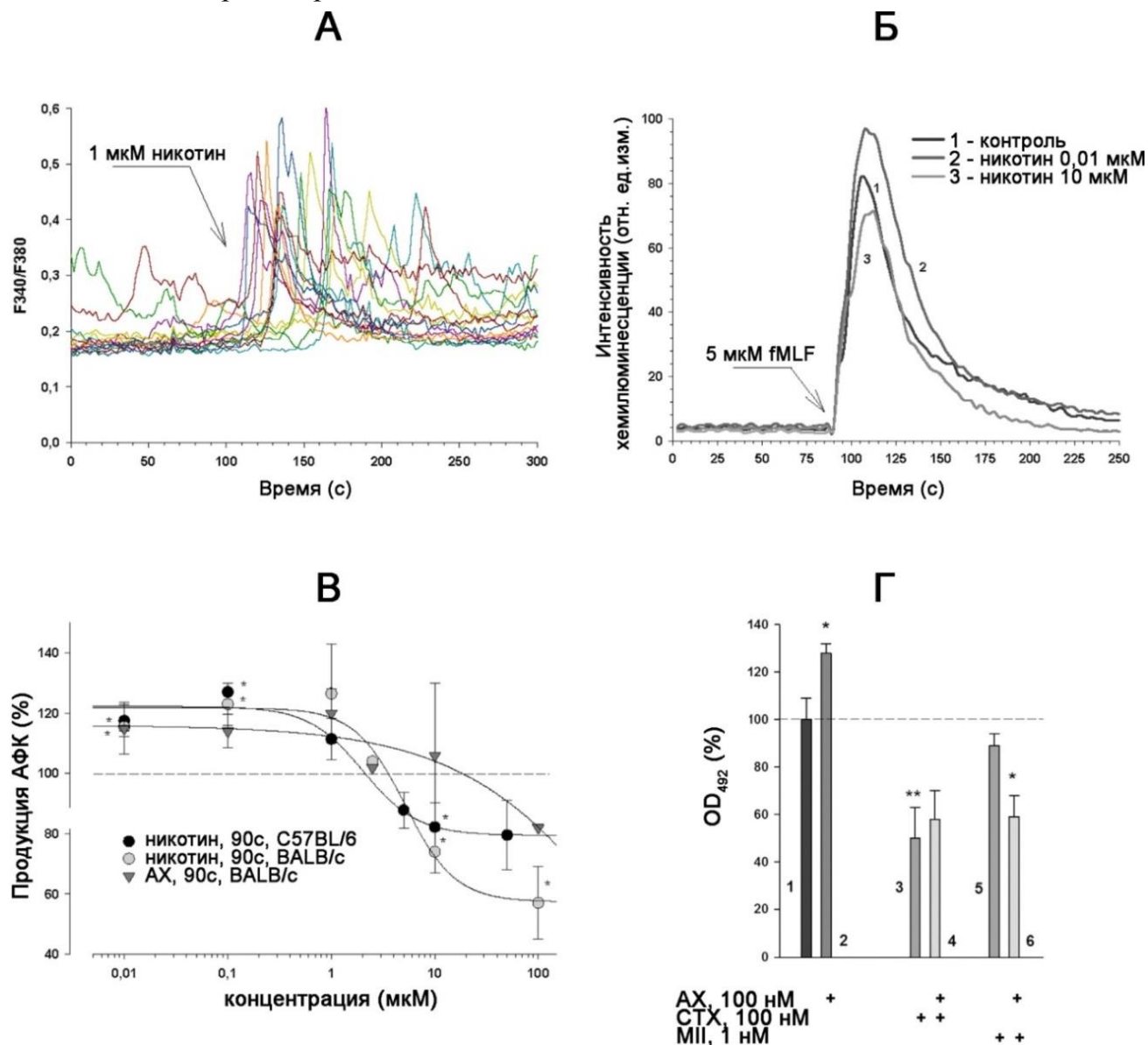


**Рис. 13 – ПЦР анализ спектра мРНК субъединиц нАХР, представленных в перитонеальных нейтрофилах самцов мышей BALB/c. С использованием суммарной мРНК нейтрофилов в качестве матрицы были амплифицированы специфические ПЦР-продукты для  $\alpha 2$ - $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$  и  $\beta 2$ - $\beta 4$  субъединиц нАХР (n = 5).**

В иммунных клетках наиболее показательным тестом активности нАХР является кальциевый имиджинг: активация рецептора приводит к кратковременному входу ионов кальция внутрь клетки с последующим высвобождением  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо. Предполагается, что в данном случае кальциевая сигнализация может запускаться как по ионотропному, так и метаботропному механизмам.

Кальциевый имиджинг выявил сильную гетерогенность популяции нейтрофилов по базовому уровню  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  и спонтанным ее изменениям (Рис. 14А). Добавление никотина (0,01 – 10 мкМ) провоцировало резкое повышение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в нейтрофилах, для которых не было замечено спонтанных осцилляций внутриклеточного уровня ионов кальция (Рис. 14А). 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 неувидительна, т.к. они могут пребывать в самых различных функциональных состояниях, для которых показана корреляция с динамикой  $[Ca^{2+}]_i$ . Активация сигнальных внутриклеточных каскадов за счет повышения  $[Ca^{2+}]_i$  важна для выполнения ряда базовых функций нейтрофилов, среди которых генерация активных форм кислорода NADPH-оксидазой для защиты от патогенных бактерий и грибов и клеточная адгезия.



**Рис. 14 – Влияние нАХР 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) Хемилуминесцентный анализ влияния холинергических агонистов на продукцию АФК, вызванную добавлением хемотактического трипептида fMLF (5 мкМ). (Б) Примеры регистрируемых ответов и (В) соответствующие кривые дозозависимости эффектов. (Г) Нормализованные показатели адгезии нейтрофилов в контроле и при часовом воздействии лигандов нАХР. Результаты приведены как среднее ± стандартная ошибка среднего, \* $p < 0,05$ , двухвыборочный t-критерий Стьюдента,  $n = 3-5$ .**



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 (N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine), известного хемотактического трипептида бактериального происхождения (Рис. 14Б, В). Антагонисты nAХР СТХ (10 нМ – 5мкМ),  $\alpha$ -конотоксины МП (0,2 мкМ) и [A10L]PnIA (1 мкМ) подавляли потенцирующее действие агонистов.  $\alpha$ -Конотоксин МП является специфическим антагонистом  $\alpha 3\beta 2$  и  $\alpha 3\alpha 6\beta 2$  nAХР, [A10L]PnIA (1 мкМ) также ингибирует  $\alpha 3\beta 2$ , но несколько более аффинен к  $\alpha 7$  nAХР. Интересна дозозависимость наблюдаемых эффектов агонистов: АХ и никотин в концентрациях 0,01 – 1 мкМ потенцировали продукцию АФК, но ингибировали при более высоких концентрациях (Рис. 14В). Вероятно, кратковременность и двухфазная дозозависимость действия агонистов объясняется быстрой десенситизацией nAХР. 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  $[Ca^{2+}]_c$  при воздействии агонистов nAХР.

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. Интересным фактом было подавление как этого эффекта, так и адгезии напрямую посредством 100 нМ СТХ (Рис. 14Г).  $\alpha$ -Конотоксин МП (1 нМ) также был способен предотвращать действие АХ (Рис. 14Г). Прямое действие СТХ на адгезивные свойства нейтрофилов может указывать на функциональную значимость заблокированного или десенситизированного состояния  $\alpha 7$  nAХР, которые могут быть не менее важны для запуска внутриклеточных каскадов в иммунных 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) nAХР влияет на основные защитные функции нейтрофилов: регулирует двухфазным образом выработку ими активных форм кислорода и усиливает их клеточную адгезию. Так, в результате активации nAХР повышенная  $[Ca^{2+}]_c$  модулирует целый ряд внутриклеточных процессов в нейтрофилах, включая активацию NADPH-оксидазы и процессы клеточной адгезии.

## 6 Нейропластичность. Норма и патология

В ЦНС млекопитающих и человека обнаружено большое разнообразие подтипов nAHR. Начиная с клонирования субъединиц нейрональных nAHR три десятилетия назад и до настоящего времени ученые стараются изучить вклад различных подтипов этих рецепторов в физиологические и патофизиологические процессы в мозге. Прогресс в понимании различных аспектов нервной передачи и сопутствующих биохимических процессов позволяет формулировать новые актуальные задачи исследований. Так, до проведения настоящей работы была практически не изучена роль nAHR в механизмах нейропластичности мозга при нейрогенезе во взрослом организме и на досимптомной стадии болезни Паркинсона.

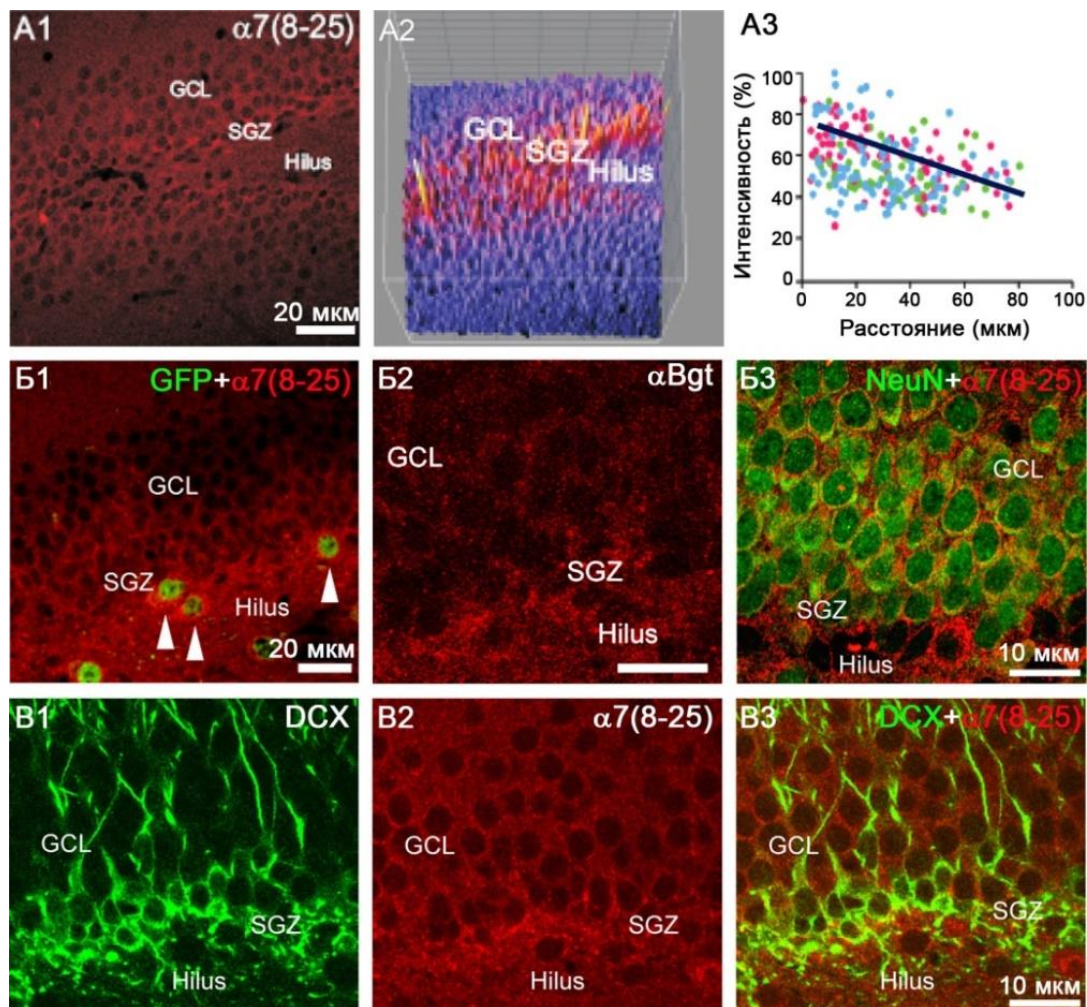
### 6.1 Нейрогенез

В гиппокампе, отделе мозга ответственном за пространственную и эпизодическую память, нейрогенез или новообразование нервных клеток 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 нейронов. Литературные данные позволяют полагать, что  $\alpha 7$  nAHR могут быть вовлечены в эти процессы, т.к. известна немаловажная роль этих рецепторов в ряде механизмов нейропластичности и роста нейритов при развитии нервных клеток на ранних этапах онтогенеза. Также этот рецептор критичен для обучения, развития и поддержания памяти и внимания. В представленной работе было решено изучить, может ли активность  $\alpha 7$  nAHR влиять на развитие новообразованных нервных клеток при нейрогенезе у взрослых грызунов.

Прицельно изучались нервные клетки зубчатой фасции гиппокампа (ЗФ), т.к. здесь новообразованные нейроны формируются и мигрируют из субгранулярной зоны ЗФ во внутреннюю треть ее гранулярного слоя, где происходит их дифференцировка и встраивание в нейрональную сеть. Гистохимическое окрашивание  $\alpha 7$  nAHR было обнаружено в субгранулярной зоне (наиболее интенсивная реакция) и внутренней трети гранулярного слоя ЗФ (Рис. 15А1-3). Специфичность использованных антител  $\alpha 7(8-25)$  была продемонстрирована в отношении пептида  $\alpha 7(8-25)$ , рекомбинантного внеклеточного домена  $\alpha 7$  субъединицы и полноразмерного  $\alpha 7$  nAHR человека после его аффинной очистки с использованием конъюгата СТХ с сефарозой. Дополнительным подтверждением специфичности наблюдаемого гистохимического окрашивания стала реакция антител  $\alpha 7(8-25)$  с ГАМК-эргическими интернейронами ЗФ (Рис. 15Б1), известными высоким уровнем экспрессии  $\alpha 7$  nAHR, а также предпочтительное связывание  $\alpha$ Bgt с субгранулярной областью ЗФ (Рис. 15Б2), которое предотвращалось преинкубацией препаратов с избытком никотина или СТХ.

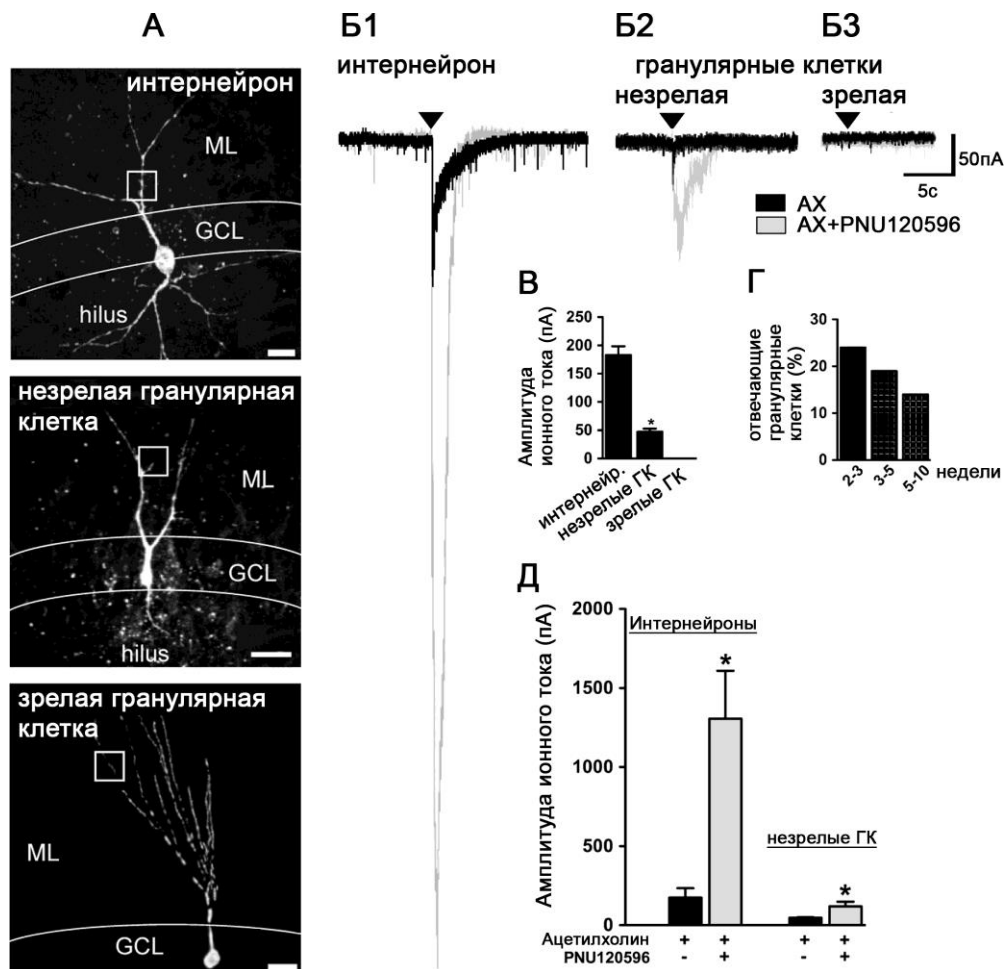
$\alpha 7$  nAHR обнаруживались на незрелых гранулярных клетках, что было показано в тестах по двойному гистохимическому окрашиванию ЗФ антителами  $\alpha 7(8-25)$  и

антителами к даблкортину (DCX, Рис.15В1-В3), белку-маркеру незрелых нейронов, ассоциированному с микротрубочками. Зрелые же гранулярные клетки, иммунопозитивные к ядерному маркерному белку NeuN, не окрашивались антителами  $\alpha 7(8-25)$  (Рис. 15Б3).



**Рис.15 – Гистохимическое окрашивание  $\alpha 7$  nAChR в зубчатой фасции (ЗФ) гиппокампа грызунов.** (A1) Визуализация  $\alpha 7$  nAChR в ЗФ крыс с использованием антител  $\alpha 7(8-25)$ . (A2) График интенсивности окраски, показанной в (A1). (A3) Корреляция между окрашиванием  $\alpha 7$  nAChR и расстоянием до субгранулярной зоны ЗФ. (Б1) Визуализация  $\alpha 7$  nAChR с помощью антител  $\alpha 7(8-25)$  (красный цвет) на телах ГАМК-эргических интернейронов (зеленый цвет) в ЗФ мышей линии GAD67-GFP. (Б2) Связывание  $\alpha$ Bgt в субгранулярной области ЗФ крыс (красный цвет). Двойное гистохимическое окрашивание клеточных слоев ЗФ крысы антителами к  $\alpha 7(8-25)$  (красный цвет) и к белкам-маркерам (Б3) зрелых (NeuN (зеленый цвет)) и (B1-B3) незрелых (даблкортин, DCX, зеленый цвет)) гранулярных клеток, соответственно. GCL – гранулярный клеточный слой; SGZ – субгранулярная зона.

Далее мы провели электрофизиологические измерения функциональной активности  $\alpha 7$  nAChR в ряде клеток ЗФ: ГАМК-эргических интернейронах, зрелых и незрелых гранулярных клетках (Рис. 16А). Идентификация клеток базировалась на их расположении в ЗФ, ряде морфологических критериев, в том числе деталях строения дендритов, и базовых электрофизиологических характеристиках.



**Рис. 16 – Функциональные  $\alpha 7$  nAChR экспрессируются незрелыми гранулярными клетками, интернейронами ЗФ. (А)** Примеры нервных клеток ЗФ, заполненных биоцитином. Масштаб: 20 мкм. **(Б)** Примеры и **(Е)** средние амплитуды АХ (3 мМ)-индуцированных ионных токов в нервных клетках ЗФ до (*черный цвет*) и после (*серый цвет*) добавления 10 мкМ PNU120596. (\* $p < 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни). **(В)** Средние амплитуды АХ-индуцированных токов в нервных клетках ЗФ мышей линии GAD67-GFP, \* $p < 0,001$ . **(Г)** Доля незрелых гранулярных клеток, реагирующих на добавление АХ, в зависимости от постнатального возраста мышей.

Как у крыс, так и у мышей добавление 3 мМ АХ в присутствии 5 мкМ атропина вызывало  $\alpha 7$  nAChR-подобные ответы в интернейронах и в незрелых гранулярных клетках (в 43% и в 17% клеток у крыс, соответственно), но не в зрелых гранулярных клетках (Рис. 16Б1-3). Стоит отметить, что ответы интернейронов были значительно больше по амплитуде, чем у незрелых гранулярных клеток (Рис. 16В). Также наблюдалась тенденция к уменьшения числа отвечающих гранулярных клеток (24 – 15%) с увеличением возраста мышей с 2 до 10 недель (Рис. 16Г). Наблюдающиеся ионные токи могли быть усилены или подавлены специфическими лигандами  $\alpha 7$  nAChR: положительным аллостерическим модулятором PNU120596 и антагонистом метиликаконитином, соответственно (Рис. 16Б1-3, Д). В совокупности, приведенные данные свидетельствуют, что функциональные  $\alpha 7$  nAChR экспрессируются

новообразованными нейронами ЗФ и располагаются на их телах и дендритах. На финальных этапах дифференцировки новых нейронов экспрессия  $\alpha 7$  nAХР угнетается.

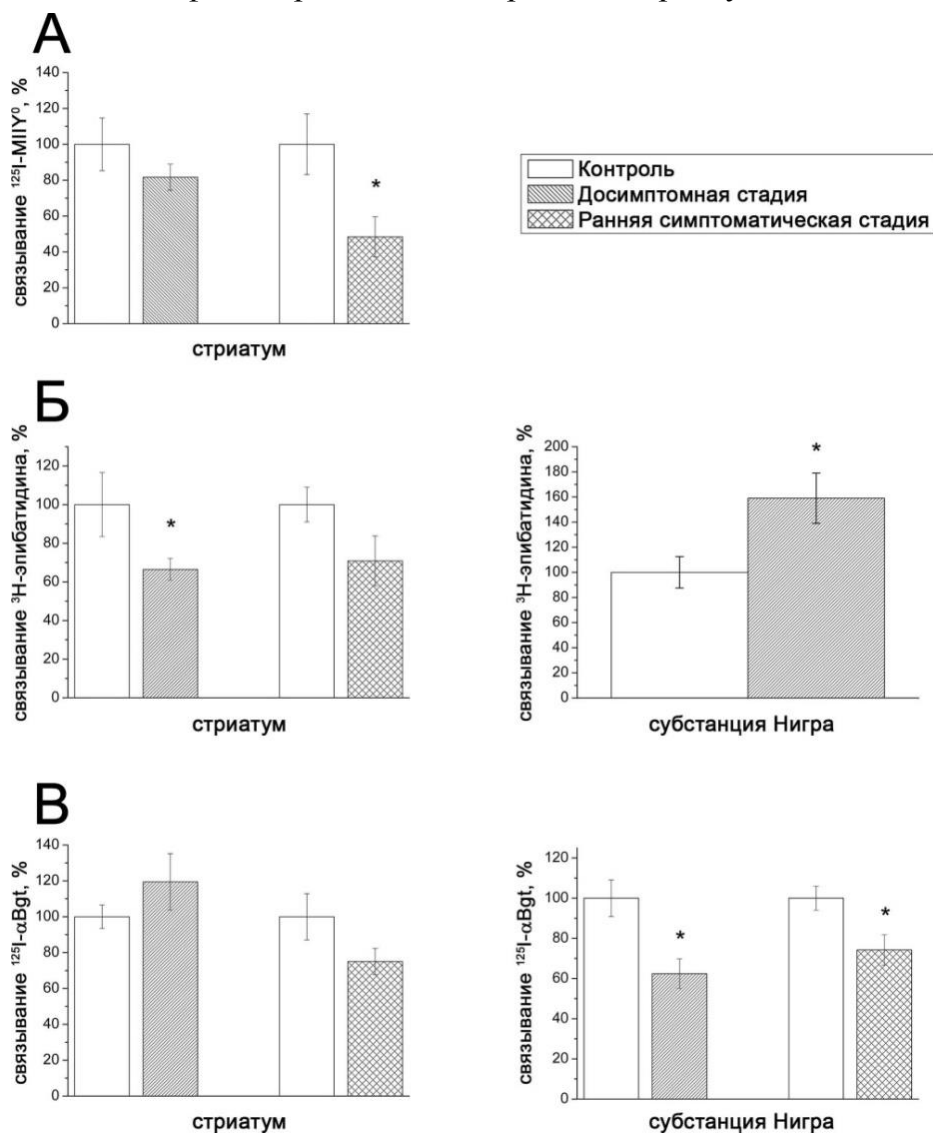
Новообразованные нейроны активно вовлекаются в нейрональные сети при формировании пространственной памяти; вероятно, они способны заменять старые дегенерирующие клетки ЗФ, а также улучшать обучаемость животных. Известно, что  $\alpha 7$  nAХР через ряд сигнальных путей в нейронах способны запускать транскрипцию генов, важных для долговременных процессов нейропластичности в ЦНС, памяти и обучаемости. Одна из предполагаемых функций  $\alpha 7$  nAХР в незрелых нервных клетках – интенсификация синаптической передачи, так называемое долговременное потенцирование определенных синаптических контактов. Полноценное развитие новообразованных нейронов в ЗФ невозможно в отсутствие  $\alpha 7$  nAХР. Так, новообразованные гранулярные клетки  $\alpha 7$ -/- мышей отличались более короткими и менее ветвистыми дендритами, а также более «незрелой» кинетикой ГАМК-эргических постсинаптических ионных токов. Из всех приведенных данных можно заключить, что холинергическая сигнализация в ЗФ, приводящая к активации обнаруженных  $\alpha 7$  nAХР в новообразованных нервных клетках, необходима для их дифференцировки и интеграции в сформированную нейрональную сеть у грызунов.

## **6.2 Ранние стадии болезни Паркинсона**

Изучение участия nAХР в нейропластичности мозга при патологических изменениях было исследовано при моделировании досимптомной и ранней симптоматической стадий болезни Паркинсона (БП) у мышей. Проводились инъекции МРТР (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина), приводящие к гибели 30 и 43% дофаминергических нейронов субстанции Нигра, а также 60 и 68% их аксональных нервных окончаний в стриатуме, соответственно. Патогенез болезни Паркинсона характеризуется прогрессирующей дегенерацией дофаминергических нейронов в нигростриатной системе, что приводит к развивающемуся двигательному расстройству у пациентов. Также этот процесс сопровождается изменениями экспрессии и функциональной активности различных подтипов nAХР, которые, в частности, способны стимулировать высвобождение дофамина.

Используемые животные модели отражают особенности развития болезни Паркинсона, а именно появление первых клинических симптомов при гибели 50 – 60% дофаминергических нейронов. Считается, что отсутствие клинических симптомов связано с развитием компенсаторных механизмов в головном мозге, которые и могут служить целью для новой более эффективной нейропротекторной терапии. В этом контексте нашей задачей было определение количественных изменений экспрессии nAХР в нигростриатной системе мышей при ранних стадиях заболевания, что может отражать их вовлеченность в компенсаторные механизмы нейропластичности.

В настоящей работе изучались наиболее представленные в мозге млекопитающих подтипы nAHP:  $\alpha 4\beta 2^*$ ,  $\alpha 6\beta 2^*$  и  $\alpha 7$ .  $\alpha$ -Конотоксин МП из яда морской улитки *Conus tagus* связывается с наномолярным сродством с  $\alpha 6\beta 2^*$  nAHP и его йодированное производное  $^{125}\text{I}$ -МПУ<sup>0</sup> с успехом применяется для обнаружения данного подтипа рецептора в ЦНС. В стриатуме на досимптомной стадии БП число сайтов связывания  $^{125}\text{I}$ -МПУ<sup>0</sup> уменьшилось до 82% от контрольного уровня и продемонстрировало дальнейшую тенденцию к снижению до 48% параллельно с развитием нейродегенеративного процесса на ранней симптоматической стадии (Рис. 17А). Таким образом, общее содержание  $\alpha 6^*$  nAHP уменьшалось в соответствии с числом погибших окончаний дофаминергических нейронов в стриатуме.



**Рис. 17 – Нормализованное содержание сайтов связывания (А)  $\alpha$ -конотоксина  $^{125}\text{I}$ -МПУ<sup>0</sup>, (Б)  $^3\text{H}$ -эпибатицина и (В)  $^{125}\text{I}$ - $\alpha\text{Bgt}$  в гомогенатах стриатума и субстанции Нигра мышей в контроле, а также при моделировании ранних стадий болезни Паркинсона. Приведены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. \* $p < 0,05$ ,  $t$ -критерий Стьюдента для независимых выборок.**

В отличие от  $\alpha 6\beta 2^*$ ,  $\alpha 4\beta 2^*$  nAHP расположены в стриатуме не только на нервных окончаниях дофаминергических нейронов, но и на других нервных клетках. В

настоящей работе  $^3\text{H}$ -эпibatидин был использован для определения совокупного содержания гетеромерных nAHR, содержащих  $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$  и  $\beta 2$  субъединицы. В стриатуме на досимптомной стадии БП количество эпibatидин-связывающих участков снижалось до 67%, а затем оставалось постоянным на ранней симптоматической стадии (Рис. 17Б). Таким образом, несмотря на заметное снижение числа  $\alpha 6^*$  nAHR при переходе от досимптомной к ранней симптоматической стадии заболевания (Рис. 17А), связывание эпibatидина остается постоянным (Рис. 17Б), что может объясняться относительным увеличением числа  $\alpha 4^*$  nAHR за счет компенсаторных механизмов пластичности мозга. Это предположение подтверждается достоверным увеличением уровня связывания эпibatидина до 160% на досимптомной стадии БП в субстанции Нигра, где расположены тела дофаминергических нейронов (Рис. 17Б).

Содержание гомопентамерных  $\alpha 7$  nAHR определялось по связыванию их специфического антагониста  $^{125}\text{I}$ - $\alpha\text{Bgt}$ . В нигростриатной системе  $\alpha 7$  nAHR расположены на 50% дофаминергических нейронов, а также на других типах нейронов и глиальных клеток. Имеется ряд фармакологических и молекулярно-биологических указаний на возможное участие  $\alpha 7$  nAHR в патогенезе БП. В настоящем исследовании в субстанции Нигра наблюдалось снижение содержания  $\alpha 7$  nAHR уже на досимптомной стадии БП (до 62%) без дальнейшего снижения при более сильном МРТР-индуцированном поражении ЦНС (Рис. 17В). Это может свидетельствовать о гибели большинства чувствительных к МРТР  $\alpha 7$ -содержащих нейронов уже на первоначальной стадии заболевания. В стриатуме мы обнаружили небольшое увеличение количества сайтов связывания  $^{125}\text{I}$ - $\alpha\text{Bgt}$  на досимптомной стадии БП (до 120%) и незначительное их уменьшение при переходе к двигательным нарушениям у животных (до 75%, Рис. 17В), однако обе тенденции были статистически не достоверными. Так как  $\alpha 7$  nAHR практически отсутствуют на нервных окончаниях дофаминергических нейронов, наблюдаемое явление может быть связано с участием в механизмах нейропластичности других типов клеток, в том числе за счет развития компенсаторных противовоспалительных процессов.

Впервые показано, что основные компенсаторные изменения в уровне экспрессии nAHR в нигростриатной системе мышей происходят уже на досимптомной стадии при моделировании БП.  $\alpha 4^*$  и  $\alpha 7$ , но не  $\alpha 6^*$  nAHR могут опосредовать компенсаторные механизмы нейропластичности на досимптомной стадии БП.

## 7 Низкомолекулярные соединения

Благодаря участию nAHR 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

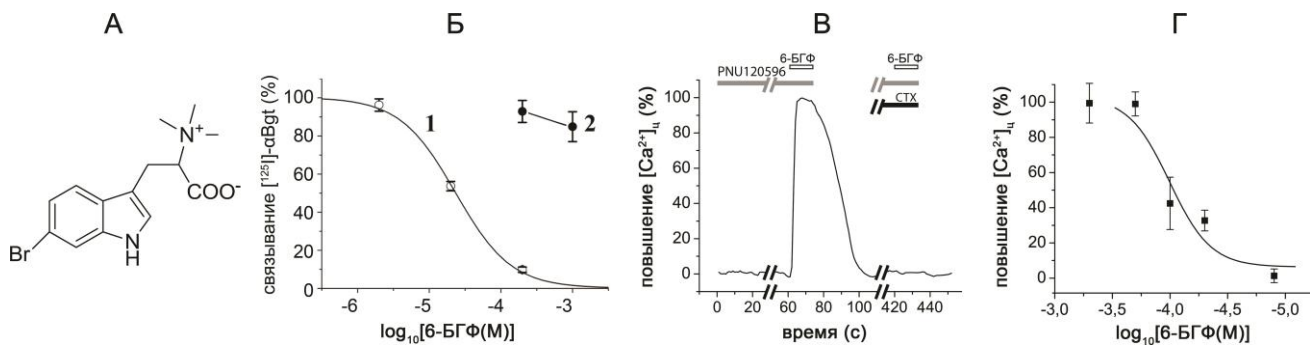
нАХР, структурно-функциональный анализ которых приведет к более полному пониманию механизма лиганд-рецепторного связывания и позволит создать соединения с заданными терапевтическими свойствами. В последнее время стартовал ряд клинических испытаний агонистов и позитивных аллостерических модуляторов нАХР, в частности,  $\alpha 7$  нАХР, для потенцирования когнитивных функций человека при различных нарушениях. «Молчащие» 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. Аналогичным обезболивающим действием в ряде животных моделей обладают антагонисты  $\alpha 9$  нАХР. Антагонисты мышечного нАХР являются известными недеполяризующими миорелаксантами, блокирующими нервно-мышечную передачу через ингибирование рецепторов на постсинаптической мембране.

### **7.1 6-бромогипафорин**

В настоящем исследовании было протестировано действие 6-бромогипафорина (6-БГФ), выделенного из тканей голожаберного моллюска *Hermisenda crassicornis*, на нАХР (Рис. 18А). Ранее 6-БГФ был обнаружен в губке *Pachymatisma johnstoni*, однако для него не задокументировали биологической активности. Методом радиолигандного анализа было показано конкурентное вытеснение 6-бромогипафоринем  $^{125}\text{I}-\alpha\text{Bgt}$  из ортостерического участка связывания  $\alpha 7$  нАХР человека ( $\text{IC}_{50} = 23$  мкМ), но отсутствие его связывания с рецептором мышечного типа *Torpedo californica* (Рис. 18Б). Для выяснения характера активности 6-БГФ был проведен кальциевый имиджинг, по результатам которого было показано его агонистическое действие на  $\alpha 7$  нАХР человека в присутствии позитивного аллостерического модулятора PNU120596 (Рис. 18В, Г,  $\text{EC}_{50} = 83$  мкМ). 6-БГФ был определен как специфический «молчащий» агонист  $\alpha 7$  нАХР, т.к. в электрофизиологии он не оказывал влияния на химерный  $\alpha 7$  нАХР/ГлиР (внеклеточный домен  $\alpha 7$  нАХР, трансмембранный и цитоплазматический домены глицинового  $\alpha 1$  рецептора) или  $\alpha 4\beta 2$  нАХР.

5,6-Дибромогипафорин, ближайший гомолог 6-БГФ, наряду с другими похожими соединениями из морских источников (5,6-дибромтриптамин, 5,6-дибром-N-метилтриптамин, 5,6-дибром-N-метилтриптофан, 5,6-дибром-N,N-диметилтриптамин) обладает противоопухолевыми и противовоспалительными свойствами. Хотя косвенные данные указывают на вероятное связывание гипафорина и его бромированных производных с клеточными рецепторами, в представленной работе впервые удалось зафиксировать и охарактеризовать взаимодействие бромированного аналога гипафорина (6-БГФ) с идентифицированной мишенью, а именно с  $\alpha 7$  нАХР человека.



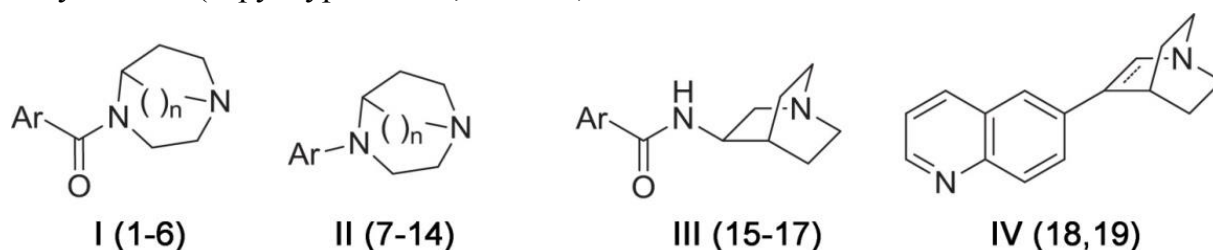


**Рис. 18** – Действие 6-бромогипафорина (6-БГФ) моллюска *Hermisenda crassicornis* на  $\alpha 7$  нАХР. (А) Химическая формула 6-БГФ. (Б) Ингибирование связывания [ $^{125}$ I]- $\alpha$ Bgt с (1)  $\alpha 7$  нАХР человека и (2) нАХР мышечного типа *T. californica* с помощью 6-БГФ. (В) Повышение  $[Ca^{2+}]_c$  в клетках Neuro2a, экспрессирующих  $\alpha 7$  нАХР человека, при добавлении 200 мкМ 6-БГФ и его ингибирование при преинкубации клеток с 2 мкМ СТХ. (Г) Кривая дозозависимости повышения  $[Ca^{2+}]_c$  от концентрации 6-БГФ. В кальциевом имиджинге все растворы лигандов содержали 10 мкМ PNU120596. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего,  $n = 3 - 5$ .

## 7.2 Производные хинолина

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

Стандартный фармакофор лигандов  $\alpha 7$  нАХР состоит из положительно заряженного атома азота, акцепторной группы водородной связи, расположенной на определенном расстоянии, и ароматической группы, обеспечивающей гидрофобные  $\pi$ - $\pi$  взаимодействия. В отличие от известных ранее производных хинолина, имеющих сходное сродство к  $\alpha 4\beta 2$  и  $\alpha 7$  нАХР, используемые нами соединения несли в своем составе азациклическую группу, содержащую положительно заряженный атом азота, что типично для ряда агонистов  $\alpha 7$  нАХР. Таким образом, кольцо хинолина или изохинолина было присоединено к азациклической группе напрямую или через амидную связь (структуры I – IV, Рис. 19).



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

**Рис. 19** – 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 [ $^3$ H]-цитизином или

[<sup>3</sup>H]-метиликаконитином за связывание с мембранными препаратами мозга крыс. Цитизин позволял протестировать взаимодействие с  $\alpha 4\beta 2$  нАХР, метиликаконитин был использован как специфический антагонист  $\alpha 7$  нАХР. Если вытеснение радиоактивных агентов составляло менее 20%, соответствующие соединения исключались из дальнейшего анализа. Результатом стал отбор соединений №7, предпочтительно взаимодействовавшего с  $\alpha 4\beta 2$  нАХР, а также №11, 13, 14 и 16, которые, напротив, оказались высокоаффинными лигандами  $\alpha 7$  нАХР (Табл. 1).

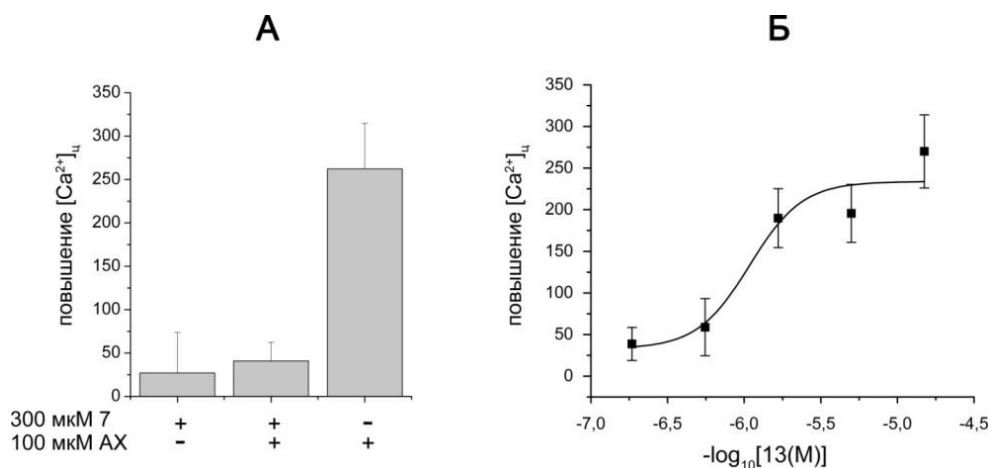
**Табл. 1 – Аффинность производных хинолина к нАХР.**

Соединение	Структура*	Радикал (Ar)*	Радиолигандный анализ		Кальциевый имиджинг
			$K_i$ (нМ)		
			$\alpha 4\beta 2$ нАХР [ <sup>3</sup> H]-цитизин	$\alpha 7$ нАХР [ <sup>3</sup> H]-MLA	$\alpha 7$ нАХР EC <sub>50</sub> (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. 19. Данные приведены как среднее ± стандартная ошибка среднего (n = 4 (радиолигандный анализ) и n = 3 (кальциевый имиджинг)).

Анализ соединений со структурами I и II позволил впервые выяснить критичные черты  $\alpha 7$  нАХР-селективного фармакофора у производных хинолина. Так, при включении в химическую формулу дополнительной карбонильной группы, изучаемые вещества утрачивали аффинность к нАХР (№1 – 6, Рис. 19). При этом предпочтительная аффинность к  $\alpha 7$  нАХР зависела от наличия 9-членного гетероцикла в составе соединения (№11 – 14, Рис. 19, Табл. 1). Из всех соединений групп III и IV только №16 было способно вытеснять [<sup>3</sup>H]-метиликаконитин из комплекса с  $\alpha 7$  нАХР, все остальные замены были фатальны для активности молекул.

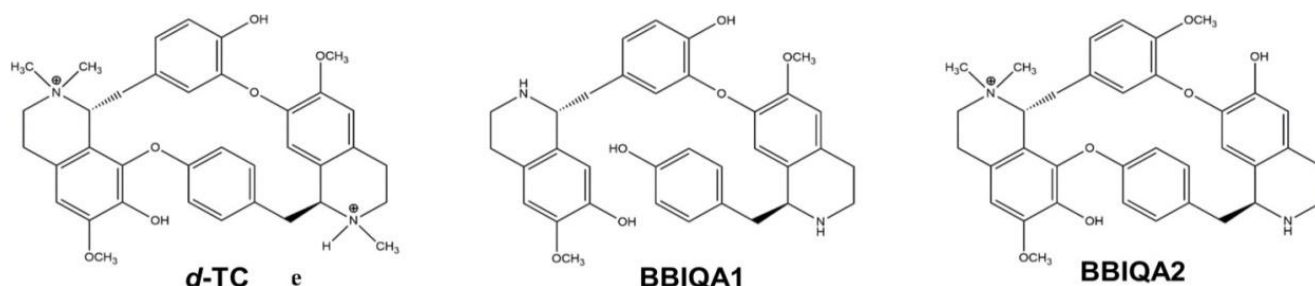
Для более детальной проверки свойств отобранных соединений был проведен кальциевый имиджинг их взаимодействия с  $\alpha 7$  нАХР человека (Рис. 20, Табл. 1). Соединение 7 в концентрациях до 300 мкМ подавляло АХ-индуцированный вход ионов кальция внутрь клеток. Напротив, соединения 11, 13 и 16 являлись агонистами  $\alpha 7$  нАХР (EC<sub>50</sub> = 1,1 – 1,6 мкМ) в присутствии 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  $\alpha 4\beta 2$  нАХР. Таким образом, соединения 11, 13 и 16 были определены как «молчащие» агонисты  $\alpha 7$  нАХР, т.к. проявляли свои свойства только в присутствии позитивного аллостерического модулятора.



**Рис. 20 – Кальциевый имиджинг активности соединений 7 и 13 в отношении  $\alpha 7$  нАХР человека. (А) Соединение 7 (300 мкМ) ингибирует повышение  $[Ca^{2+}]_{i}$  в клетках Neuro2a, экспрессирующих  $\alpha 7$  нАХР, индуцированное добавлением АХ. (Б) Кривая дозозависимости степени повышения  $[Ca^{2+}]_{i}$  в клетках Neuro2a, экспрессирующих  $\alpha 7$  нАХР, от концентрации соединения 13. Измерения проводились в присутствии 10 мкМ PNU120596. Данные приведены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего,  $n = 3$ .**

### 7.3 Алкалоиды из яда кураре племени Matis

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 (*d*-ТС, Рис. 21), выделенный из *Chondodenron tomentosum*, был введен в клиническую практику как миорелаксант, снижающий необходимую степень анестезии при проведении операций. В настоящее время используются его более эффективные и безопасные аналоги, но и они не лишены ряда побочных эффектов, обусловленных их недостаточной селективностью. Весьма актуальны исследования ключевых структурных элементов миорелаксантов, важных для их высокой селективности. Кроме того, идеальный релаксант должен обладать быстрым началом и короткой – средней продолжительностью действия.



**Рис. 21 – Химические формулы *d*-тубокурарина (*d*-ТС) и новых 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

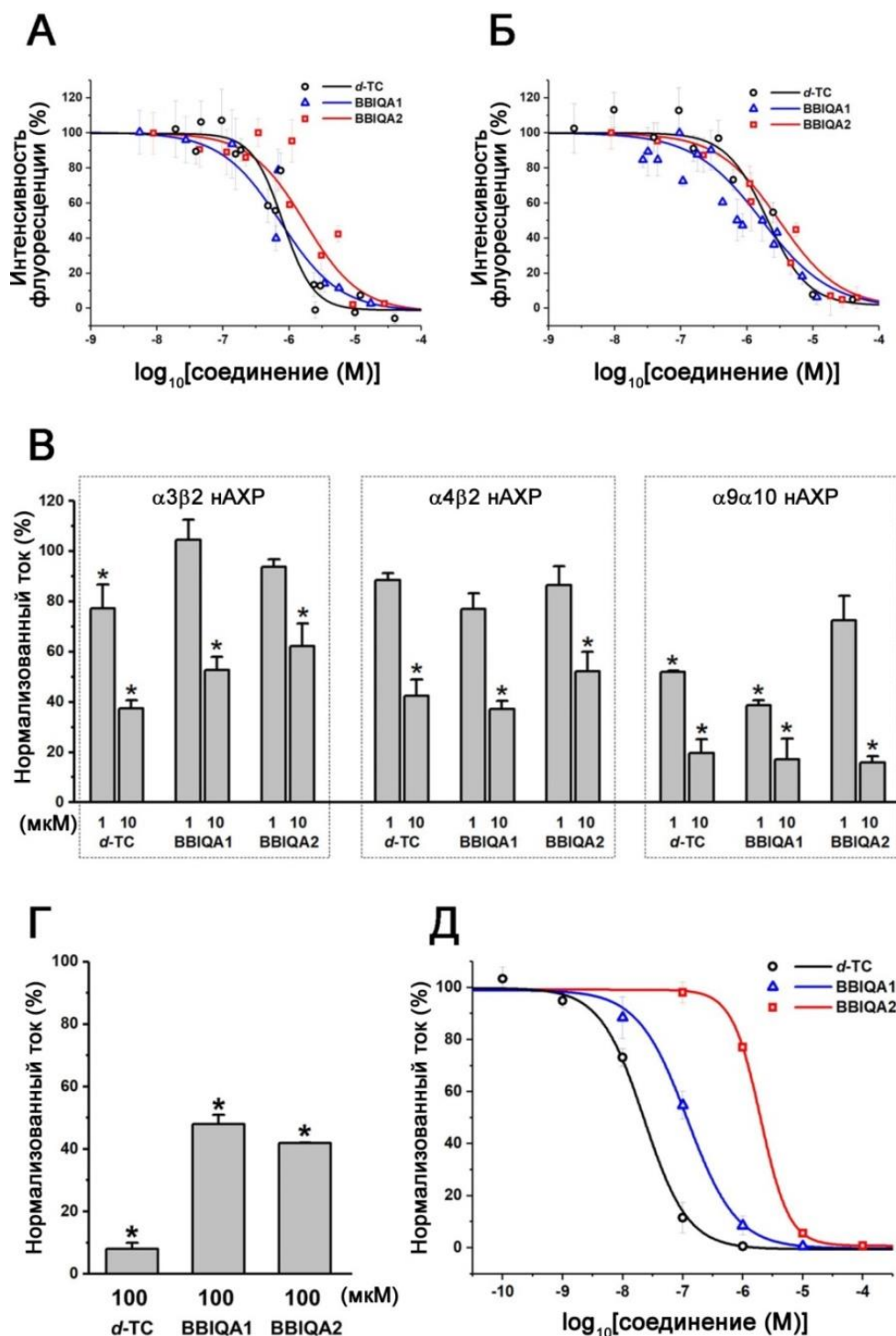
(bisbenzyltetrahydroisoquinoline alkaloids), выделенных из яда кураре бразильского племени Матис, с Cys-петельными рецепторами (Рис. 21, 22). Проводилось сравнение активности ВВІQA 1, 2 и их структурного аналога *d*-тубокурарина (*d*-ТС), хорошо изученного ингибитора  $\alpha$ 7 нАХР и других Cys-петельных рецепторов. (Рис. 21, 22).

**Табл. 2 – Значения параметров IC<sub>50</sub> взаимодействия *d*-ТС и его аналогов ВВІQA 1, 2 с АХСБ *A. californica*, нАХР мышечного типа *T. californica*, мышечным  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 $\epsilon$  $\delta$  нАХР,  $\alpha$ 7 нАХР и 5-НТ<sub>3A</sub> рецептором серотонина.**

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

ВВІQA 1 и 2 были способны конкурировать с [<sup>125</sup>I]- $\alpha$ Vgt за связывание с ацетилхолинсвязывающим белком (АХСБ) *A. californica* столь же успешно как и *d*-ТС, однако они заметно уступали ему в аффинности к полноразмерному нАХР мышечного типа  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 $\gamma$  $\delta$  ската *T. californica* (в 67 и 22 раза, соответственно, Табл. 2). При связывании с  $\alpha$ 7 нАХР человека особо низкой аффинностью отличался ВВІQA 1 (IC<sub>50</sub> = 162 мкМ), а дозозависимости для *d*-ТС и ВВІQA 2 оказались весьма схожи (IC<sub>50</sub> = 7,77 и 5,52 мкМ, соответственно). В функциональном тесте кальциевого имиджинга новые алкалоиды ВВІQA 1 и 2 были весьма сходны с *d*-ТС по эффективности ингибирования как мышечного  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 $\epsilon$  $\delta$  нАХР мышцы (Табл. 2, Рис. 22А), так и  $\alpha$ 7 нАХР человека (Табл. 2, Рис. 22Б). Сравнение результатов радиолигандного анализа связывания исследуемых веществ с ортостерическими сайтами рецепторов и данных кальциевого имиджинга говорит о сложном механизме ингибирования функционального ответа мышечного и  $\alpha$ 7 нАХР как *d*-тубокурарином, так и ВВІQA 1, 2. Дополнительный эксперимент кальциевого имиджинга по изучению влияния возрастающих концентраций *d*-ТС и ВВІQA 1, 2 на форму кривой дозозависимости АХ-индуцированного ответа  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 $\epsilon$  $\delta$  нАХР подтвердил смешанный конкурентный/неконкурентный механизм ингибирования для этих соединений. Так, наблюдалось не только увеличение EC<sub>50</sub> (АХ) = 8 мкМ в присутствии *d*-ТС, ВВІQA 1 и 2 в концентрации IC<sub>50</sub> до 33, 27 и 18 мкМ и в концентрации 3хIC<sub>50</sub> до 65, 50 и 25 мкМ, соответственно, но также и снижение соответствующей амплитуды кальциевого клеточного ответа. Результаты радиолигандного анализа и кальциевого имиджинга

свидетельствуют, что аналогичный комплексный механизм связывания может быть характерен и для взаимодействия ВВІQА 1, 2 с  $\alpha 7$  нАХР (Табл. 2, Рис. 22Б).



**Рис. 22 – Ингибирующее действие  $d$ -ТС, ВВІQА 1 и ВВІQА 2 на Cys-петельные рецепторы:** (А) мышечный  $\alpha 1\beta 1\epsilon \delta$  нАХР, (Б)  $\alpha 7$  нАХР, (В) нейрональные гетеромерные нАХР, (Г)  $\alpha 3\beta 2\gamma 2$  ГАМК<sub>A</sub>-рецептор и (Д) 5-НТ<sub>3A</sub>-рецептор серотонина. Активация гетерологически экспрессированных рецепторов происходила в кальциевом имиджинге под действием (А) 30 мкМ АХ и (Б) 10 мкМ АХ (в присутствии 10 мкМ PNU120596) и в электрофизиологии под действием (В) никотина (50 мкМ ( $\alpha 3\beta 2$  нАХР) и 10 мкМ ( $\alpha 4\beta 2$  нАХР)) и 25 мкМ АХ ( $\alpha 9\alpha 10$  нАХР), (Г) 100 мкМ ГАМК и (Д) 1 мкМ серотонина. Данные приведены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n = 3 - 5$ ). \* $p < 0,05$  (однофакторный дисперсионный анализ с тестом Tukey).

Средняя аффинность алкалоидов ВВІQA 1, 2 к мышечному nАХР является положительной характеристикой для их фармакологического потенциала, т.к. известно, что именно низкоаффинные лиганды обладают быстрым началом и короткой или средней продолжительностью миорелаксантного действия, что и требуется для разработки эффективного лекарственного средства.

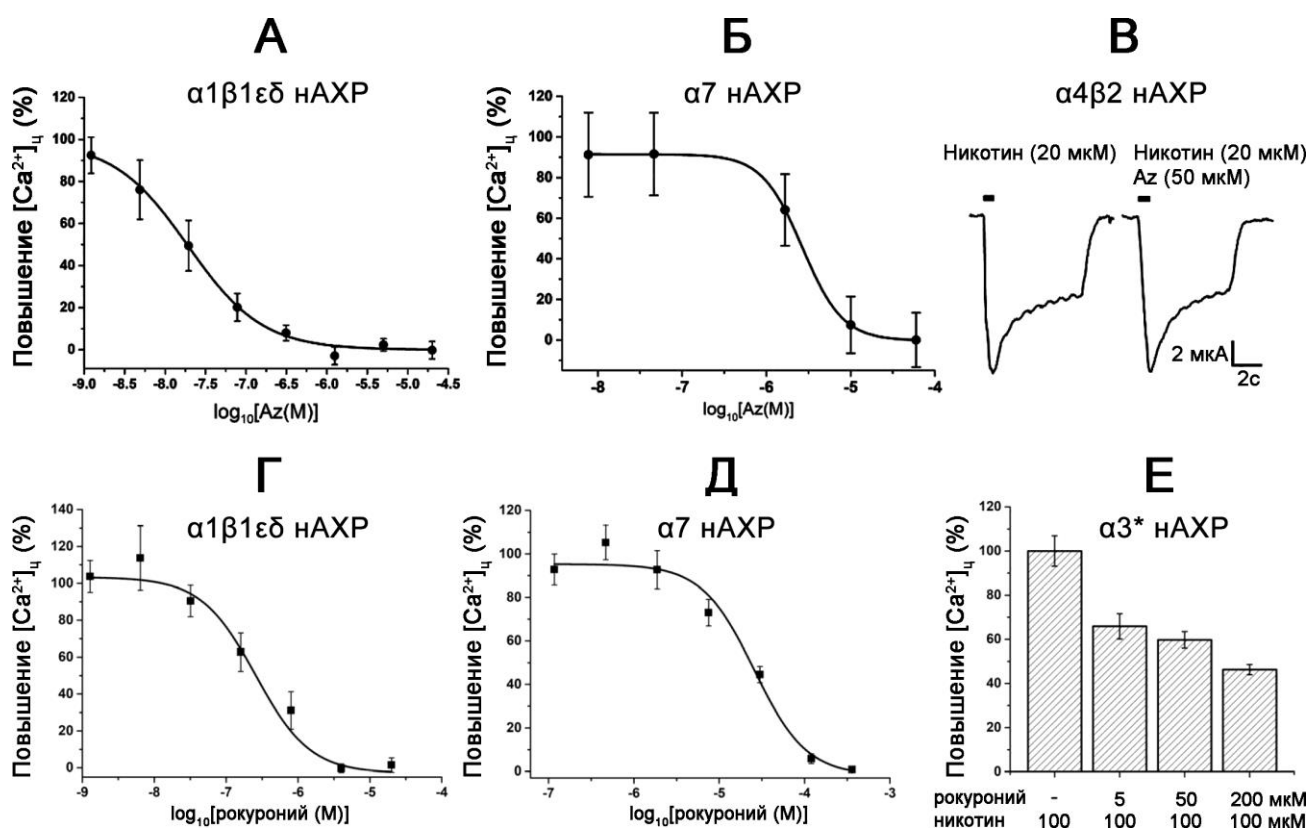
Электрофизиологический анализ показал, что эффективность ингибирования нейрональных гетеромерных nАХР ( $\alpha\beta 2$  и  $\alpha 9\alpha 10$  nАХР человека и  $\alpha 4\beta 2$  nАХР крысы) под действием ВВІQA 1, 2 и *d*-ТС была сходной (Табл. 2, Рис. 22В). Однако ВВІQA 1 и 2 заметно уступали *d*-ТС по их ингибирующему действию в отношении других представителей Cys-петельных рецепторов:  $\alpha\beta 2\gamma 2$  ГАМК<sub>A</sub>-рецептора мыши и 5-НТ<sub>3A</sub>-рецептора серотонина (Табл. 2, Рис. 22Г, Д). Так, в отношении 5-НТ<sub>3A</sub>-рецептора ВВІQA 1 и 2 были в 5 и 87 раз менее активными, чем *d*-ТС, соответственно. Таким образом, результатом минимальных структурных отличий ВВІQA 1, 2 от *d*-ТС (Рис. 21) стала выраженная селективность новых алкалоидов в отношении nАХР, что повышает их фармакологический потенциал и делает их удобной моделью для проведения дальнейшего рационального дизайна.

## **8 Доклинические исследования эффективности и безопасности лекарственного средства на основе синтетического пептида аземиопсина в качестве миорелаксанта**

Миорелаксанты пептидной природы могут рассматриваться как альтернатива низкомолекулярным алкалоидам, обладающим многими нежелательными побочными эффектами, а также ботулиническому токсину, который является основным лекарственным препаратом для облегчения состояния при мышечных дистониях и спастической форме детского церебрального паралича. Пептиды не относятся к ксенобиотикам и, как правило, обладают высокой селективностью к конкретным мишеням, что обусловлено самой природой пептидно-белковых взаимодействий. 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 миорелаксанта периферического действия.

Ранее в экспериментах по конкурентному радиолигандному анализу аземиопсин демонстрировал высокое сродство к nАХР мышечного типа ската *Torpedo* ( $IC_{50} = 0,18 \pm 0,03$  мкМ) и более низкую эффективность связывания с  $\alpha 7$  nАХР человека ( $IC_{50} = 22 \pm 2$  мкМ). В настоящей работе было обнаружено, что Az является высокоаффинным ингибитором функциональной активности мышечного nАХР мыши (Рис. 23А,  $IC_{50} = 19 \pm 8$  нМ), менее эффективным для  $\alpha 7$  nАХР человека (Рис. 23Б,  $IC_{50} = 2,67 \pm 0,02$  мкМ) и не действует на нейрональные гетеромерные  $\alpha 4\beta 2$  (Рис. 23В) и  $\alpha 3^*$  nАХР. Az был более высокоаффинным ингибитором мышечного и  $\alpha 7$  nАХР по сравнению с

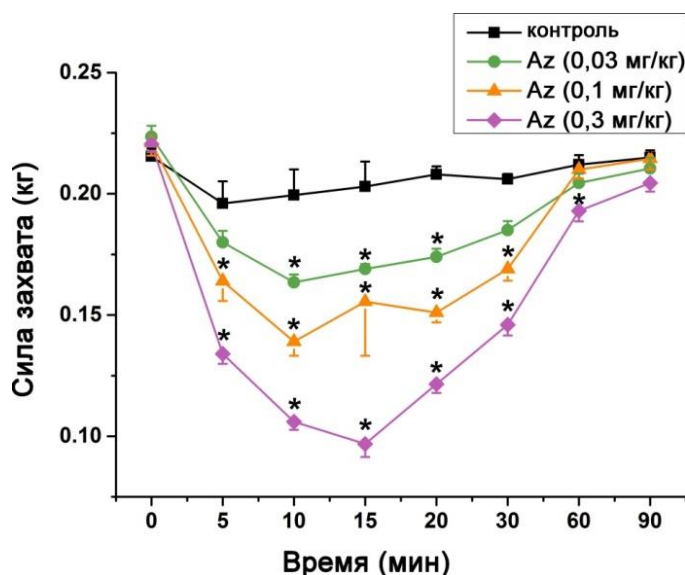
известным недеполяризующим миорелаксантом рокуронием ( $IC_{50} = 257,06 \pm 95,54$  нМ ( $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$  нАХР, Рис. 23Г) и  $25,69 \pm 4,5$  мкМ ( $\alpha 7$  нАХР, Рис. 23Д)). К тому же Az оказался более высокоселективным в отношении мышечного нАХР: Az не действовал на гетеромерные нейрональные нАХР (рокуроний ингибировал  $\alpha 3^*$  нАХР (Рис. 23Е)), а также на 5-НТЗ рецепторы и  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ ,  $\alpha 2\beta 3\gamma 2$  ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы, а соотношение констант ингибирования  $\alpha 7$  и мышечного нАХР составляло для Az 140:1 против 100:1 для рокурония. Таким образом, Az более избирателен к нАХР мышечного типа, чем клинически используемые миорелаксанты, ингибирующие в низких микромолярных концентрациях гетеромерные нАХР ( $\alpha 3\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 4$ ,  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 7$  и др.), что может обуславливать меньшее число нежелательных побочных эффектов от его применения.



**Рис. 23 – Az и рокуроний ингибируют мышечный и нейрональные нАХР.** Кривые ингибирования (А, Б) Az и (Г, Д) рокуронием АХ-индуцированного повышения  $[Ca^{2+}]_c$  в клетках Neuro2a, экспрессирующих (А, Г) мышечный  $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$  (30 мкМ АХ) и (Б, Д)  $\alpha 7$  нАХР (10 мкМ АХ). (В) Примеры никотин-индуцированных ионных токов в  $\alpha 4\beta 2$  нАХР в контроле и в присутствии Az. (Е) Ингибирование рокуронием никотин-индуцированного повышения  $[Ca^{2+}]_c$  в клетках SH-SY5Y, экспрессирующих  $\alpha 3$ -содержащие нАХР. Приведены среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего, n = 4.

Миорелаксантное действие Az достоверно проявилось при его однократном введении в трицепсы передних конечностей мышей (Рис. 24). Эффективными были дозы 0,03, 0,1 и 0,3 мг/кг, миорелаксантный эффект наступал через 5 минут после введения Az и длился в течение 25 – 55 мин. Аналогичный эффект от введения 0,1 мг/кг рокурония (единственная эффективная и безопасная доза) наступал на 1-ой минуте и исчезал уже через 3 минуты после инъекции мышам. Сравнение полученных

результатов с опубликованными данными для другого недеполяризующего миорелаксанта, панкурония, также продемонстрировало большую эффективность Az. В дозе 0,1 мг/кг миорелаксантный эффект от введения Az и панкурония составлял 37% и 24,1%, соответственно. 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).



**Рис. 24 – Миорелаксантный эффект Az.** Графики временной зависимости изменения силы захвата планки измерительного прибора передними конечностями самцов мышей ICR после в/м введения Az или физиологического раствора (контроль). Представлены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего,  $n = 10$ ,  $*p < 0,05$ , однофакторный дисперсионный анализ для повторных измерений.

Изучение фармакокинетики Az в  $^{125}\text{I}$ -меченной форме при его однократном внутривенном (в/в) и внутримышечном (в/м) введении мышам в дозах 0,25 и 0,5 мг/кг показало, что максимальная концентрация [ $^{125}\text{I}$ ]-Az в крови наблюдалась через 1 (в/в) и 5 (в/м) минут после инъекции, а период его полувыведения составлял 15 – 20 (в/в) и 20 – 40 (в/м) минут (Рис. 25). При обоих способах введения препарат почти полностью удалялся из свободного кровотока за 24 часа. Внутривенный способ введения отличала более высокая максимальная концентрация препарата в крови. При в/м введении Az наблюдалась хорошая корреляция между временем полувыведения (20 – 40 мин, Рис. 25) и длительностью миорелаксантного эффекта (25 – 55 мин, Рис. 24). По своим фармакокинетическим параметрам Az похож на миорелаксанты со средней (17 – 71 мин (данные для человека)) или даже с длительной продолжительностью действия.

Параметр ЛД<sub>50</sub> при внутрибрюшинном и внутривенном введении Az мышам составлял  $2,57 \pm 0,27$  мг/кг и  $0,51 \pm 0,06$  мг/кг, соответственно. ЛД<sub>50</sub> рокурония оценено как 0,3 мг/кг (в/в введение крысам), для (+)-тубокурарина и векурония – 0,11 мг/кг и 0,05 мг/кг (в/в введение мышам), соответственно. При внутримышечной инъекции ЛД<sub>50</sub> и максимальная переносимая доза Az составляли  $0,73 \pm 0,13$  и 0,7 мг/кг, соответственно. Доза рокурония 0,13 мг/кг была полностью летальной для животных. Внешние признаки интоксикации появлялись через 5 – 7 минут после введения Az и достигали максимальной интенсивности за 10 – 20 минут. Через час основные признаки интоксикации исчезали, полное же восстановление происходило за 24 часа.



Таким образом, Az обладает более низкой острой токсичностью по сравнению с клинически применяемыми периферически действующими миорелаксантами.

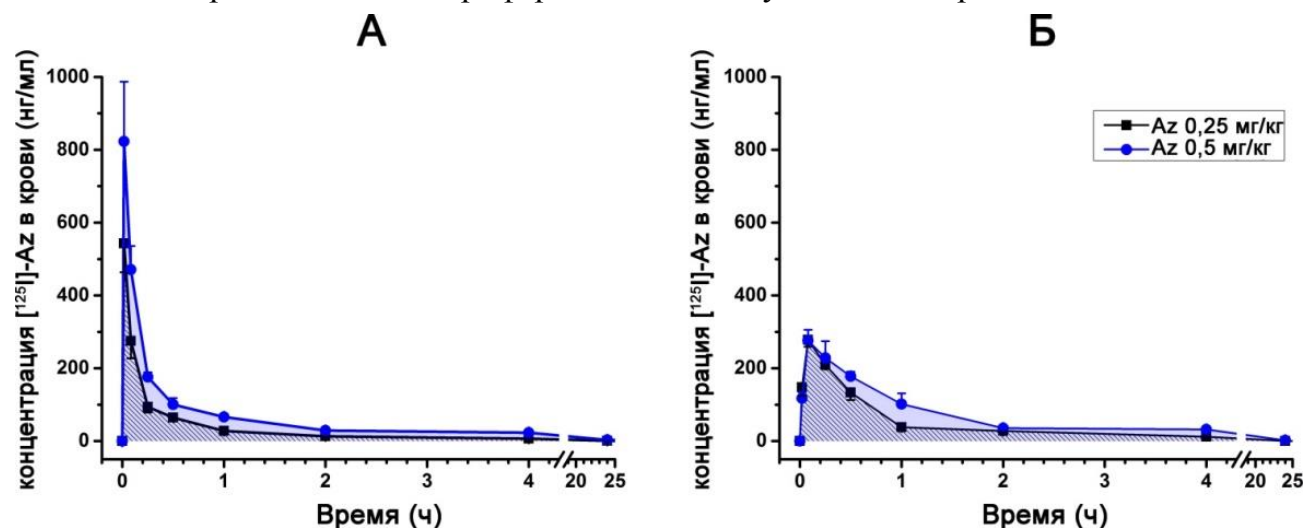


Рис. 25 – Фармакокинетические кривые изменения концентрации  $[^{125}\text{I}]\text{-Az}$  в крови самцов мышей ICR через 0 – 24 часа после его (А) внутривенного и (Б) внутримышечного введения в дозах 0,25 и 0,5 мг/кг. Результаты представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартное отклонение,  $n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

Исследование субхронической токсичности Az показало отсутствие клинических проявлений интоксикации при его многократном в/м введении крысам в дозах 0,1 и 0,5 мг/кг в течение 14 дней с двухнедельным периодом отмены. Az не влиял на средний прирост массы тела и потребление корма крысами, существенно не изменял гематологических и биохимических показателей крови крыс относительно физиологически нормальных показателей. Гистологический анализ ряда внутренних органов не выявил патологических изменений. Таким образом, Az при 14-дневном в/м введении крысам в дозах 0,1, 0,5 мг/кг с периодом отмены не проявил токсичности.

Иммунотоксичность Az изучалась комплексно с применением следующих тестов: 1) тест по изучению воздействия Az на клеточный иммунитет по реакции гиперчувствительности замедленного типа при иммунизации мышей тринитробензолсульфоновой кислотой, 2) тест по изучению иммунного ответа мышей на введение стандартного антигена (БСА) и 3) тест по изучению фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов мышей. Все три теста были выполнены после 7-дневного в/м введения Az в дозах 0,15 и 0,5 мг/кг самцам мышей ICR. Ни в одном из тестов не было обнаружено негативных последствий для стандартных функций иммунной системы после недельного в/м введения Az мышам.

Признаков аллергических реакций на введение Az не было замечено ни в одном из проведенных *in vivo* тестов, в том числе он не вызывал реакции гиперчувствительности замедленного типа у мышей. Это положительно характеризует его фармакологический потенциал, т.к. именно недеполяризующие миорелаксанты вызывают 50 – 70% аллергических реакций во время анестезии.

Az не обладал мутагенными свойствами в стандартном тесте на индукцию мутаций в гене гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы в линии клеток яичника китайского хомяка CHO-k1. Для рокурония известны мутагенные способности, выражающиеся в возникновении хромосомных перестроек и повышении частоты возникновения микроядер в лимфоцитах периферической крови человека.

Таким образом, Az превосходит клинически применяемый недеполяризующий миорелаксант бромид рокурония по селективности, миорелаксантами активности, широте терапевтического окна и др. Az – быстродействующий агент со средней продолжительностью действия, он не накапливается в организме и не имеет активных метаболитов, в качестве его антагониста могут использоваться стандартные клинически применяемые антагонисты недеполяризующих миорелаксантов.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В ходе выполнения диссертационной работы был получен ряд новых фундаментальных знаний о физиологической и патофизиологической роли никотиновых и родственных рецепторов нейромедиаторов в нервной и иммунной системах, пересмотрена селективность и механизм связывания их известных белковых ингибиторов, а также выявлены неизвестные ранее структурные черты, определяющие селективность и характер действия их низкомолекулярных лигандов. Практическая ценность работы состоит в разработке новых инструментальных подходов, обнаружении ранее неизвестных аспектов функционирования Cys-петельных рецепторов при патологических состояниях и открытии их новых фармакологически-перспективных лигандов, в том числе доклинически испытанного недеполяризующего миорелаксанта.

В ходе выполнения диссертационной работы был разработан и апробирован комбинаторный подход для изучения клеточно-тканевой экспрессии и количественных характеристик функциональной активности Cys-петельных рецепторов. Эффективность и универсальность сочетания радиолигандного и флуоресцентного анализа с использованием трехпетельных  $\alpha$ -нейротоксинов змей с методами электрофизиологии и кальциевого имиджинга была продемонстрирована как при выяснении функциональной роли никотиновых и родственных рецепторов нейромедиаторов в физиологических и патофизиологических процессах в организме (рецепции боли, нейрогенезе и др.), так и при скрининге и характеристике свойств их новых низкомолекулярных и пептидно-белковых лигандов (изучении аффинности, селективности, механизма связывания и др.). В предложенный комплексный подход входит ряд впервые разработанных методик.

В настоящей работе обнаружен ряд новых эффектов холинергической иннервации в процессах ноцицепции (рецепции боли), воспаления и нейропластичности. До проведения настоящего исследования оставалась неизученной

роль холинергической иннервации оболочек головного мозга (основного места зарождения болевых сигналов) в патофизиологии мигрени. Впервые установлено, что активация nAHP и mAHP в оболочках головного мозга приводит к усилению болевой сигнализации. Для эндогенного АХ подобный эффект был замечен при повышении концентрации нейропептида CGRP, характерной черте патогенеза мигрени. Молекулярные мишени наблюдаемого эффекта были определены как на ноцицептивных нейронах, так и на иммунных клетках. Предложена обобщающая модель эффектов холинергической иннервации оболочек головного мозга при ноцицепции. Она включает выброс провоспалительных агентов и цитокинов тучными клетками, выход плазмы крови, возбуждение и сенситизацию ноцицептивных нервных волокон, приводящее к развитию болевых ощущений.

Тесная взаимосвязь функционирования холинергической нервной и иммунной систем организма проявилась и при изучении влияния активности nAHP на защитные функции нейтрофилов, самых быстрых и мощных эффекторов острой фазы воспаления среди иммунных клеток. Так, впервые было обнаружено, что при развитии воспалительной реакции активация  $\alpha 7$  и  $\alpha 3\beta 2$  (возможно, также  $\alpha 6^*$ ) nAHP регулирует двухфазным образом выработку нейтрофилами активных форм кислорода и усиливает их клеточную адгезию. Активация nAHP индуцирует кратковременный вход ионов кальция внутрь клетки нейтрофила и последующий выход  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо, что влияет на целый ряд внутриклеточных процессов, включая активацию NADPH-оксидазы и процессы клеточной адгезии нейтрофилов.

Холинергическая иннервация чрезвычайно важна для процессов нейропластичности мозга при физиологическом состоянии и при патологических нарушениях. Ранее было известно, что на ранних этапах онтогенеза функциональная активность  $\alpha 7$  nAHP критична для правильного развития нейрональных сетей головного мозга. В представленной работе впервые получены подобные данные для новообразованных нейронов взрослых грызунов. Установлено, что холинергическая сигнализация в зубчатой фасции гиппокампа, приводящая к активации  $\alpha 7$  nAHP в новообразованных нейронах, необходима для физиологического протекания их дифференцировки и интеграции в сформированную нейрональную сеть у грызунов.

Компенсаторные процессы нейропластичности мозга характерны для ранних стадий болезни Паркинсона (БП), раскрытие деталей которых может послужить основой для создания новой эффективной нейропротекторной терапии. При БП серьезно нарушается функционирование не только дофаминергической nigrostriatной системы, но и холинергической нервной системы. В настоящей работе впервые показано, что основные компенсаторные изменения в уровне экспрессии  $\alpha 4^*$  и  $\alpha 7$  nAHP в nigrostriatной системе происходят на досимптомной стадии при моделировании БП у мышей. Уровень же экспрессии  $\alpha 6^*$  nAHP, считающегося особенно уязвимым, уменьшается в соответствии с числом погибших окончаний

дофаминергических нейронов. Таким образом,  $\alpha 4^*$  и  $\alpha 7$  nAХР могут опосредовать компенсаторные механизмы нейропластичности на досимптомной стадии БП.

В настоящей работе были получены новые научные знания о молекулярных мишенях и механизмах связывания трехпетельных белковых ингибиторов Cys-петельных рецепторов. Впервые обнаружено, что трехпетельные  $\alpha$ -нейротоксины змей, классические конкурентные антагонисты nAХР, эффективно ингибируют природные ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы. В отношении nAХР они являются структурно-функциональными аналогами, но проявляют сильную гетерогенность в селективности, аффинности и механизме связывания с неклассическими мишенями: ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами и моделями лиганд-связывающего участка nAХР.  $\alpha$ -Кобратоксин оказался наиболее эффективным антагонистом ГАМК<sub>A</sub>-рецептора, взаимодействуя с ним по смешанному (конкурентному/неконкурентному) механизму. Для  $\alpha$ -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 Lуб. Однако селективность и механизм действия SLURP-1 (81 а.о., 5 дисульфидных связей), секретируемого представителя Lуб белков и участника клеточных регуляторных механизмов кожи, нервной и иммунной систем человека, оставался неоднозначным. Основной молекулярной мишенью считался  $\alpha 7$  nAХР, однако ряд рекомбинантных форм SLURP-1 демонстрировали существенно различающиеся модулирующие активности. В настоящей работе впервые изучен синтетический белок SLURP-1 и определено, что он предпочтительно ингибирует гетеромерные nAХР (наиболее эффективно  $\alpha 3\beta 4$  nAХР), являясь негативным аллостерическим модулятором  $\alpha 7$  и  $\alpha 9\alpha 10$  nAХР. 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,  $\alpha$ -нейротоксин «необычного типа».

Новая информация о ключевых чертах nAХР-селективного фармакофора была получена для производных хинолина и гипафорина, а также алкалоидов *d*-тубокураринового типа. Так, был проведен структурно-функциональный анализ свойств ряда новых специфических «молчащих» агонистов  $\alpha 7$  nAХР природного (6-бромогипафорин голожаберного моллюска *Hermisenda crassicornis*) и синтетического (производные хинолина) происхождения, а также новых антагонистов Cys-петельных рецепторов (алкалоидов ВВІQА из яда кураре племени Матис). Если для бромированного аналога гипафорина впервые идентифицирована молекулярная мишень ( $\alpha 7$  nAХР), то для новых производных хинолина удалось существенно повысить их селективность в отношении данного рецептора путем включения в их состав азациклических фрагментов, типичных для специфических лигандов  $\alpha 7$  nAХР. Оказалось, что хинолиновая и азациклическая группы должны быть связаны

напрямую, а предпочтительная аффинность к  $\alpha 7$  nAХР зависит от наличия 9-членного гетероцикла в составе соединения. Анализ свойств новых алкалоидов ВВІQА показал, что даже минимальные отличия в их структурах от *d*-тубокурарина (например, отличающееся положение двух метильных групп (ВВІQА2)) приводят к существенно более высокой селективности в отношении nAХР, но не родственных 5-НТЗ и ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов. Выраженная селективность новых агонистов и антагонистов nAХР повышает их фармакологический потенциал в качестве противовоспалительных (обезболивающих) агентов и недеполяризующих миорелаксантов, соответственно, а полученная новая структурная информация позволит применить их формулы для проведения дальнейших направленных модификаций.

В представленной диссертационной работе успешно проведены доклинические исследования безопасности и эффективности недеполяризующего миорелаксанта пептидной природы – лекарственного средства на основе синтетического пептида аземиопсина, конкурентного ингибитора мышечного nAХР. По специфической активности и селективности исследуемый препарат превосходит клинически применяемый недеполяризующий миорелаксант бромида рокурония и перспективен для проведения дальнейшего клинического тестирования.

## ВЫВОДЫ

- 1) Разработан уникальный комплексный подход для изучения клеточно-тканевой локализации и функциональных характеристик Суs-петельных рецепторов, сочетающий флуоресцентный и радиолигандный анализ с использованием пептидно-белковых нейротоксинов, а также метод кальциевого имиджинга и электрофизиологию.
- 2) Впервые обнаружено, что  $\alpha$ -кобратоксин, трехпетельный  $\alpha$ -нейротоксин, являющийся классическим конкурентным антагонистом nAХР, ингибирует природные подтипы ГАМК<sub>A</sub>-рецептора по смешанному механизму. Впервые показано, что синтетический трехпетельный белок человека SLURP-1 предпочтительно ингибирует гетеромерные  $\alpha 3^*$  и  $\beta 4^*$  nAХР, являясь негативным аллостерическим модулятором  $\alpha 7$  и  $\alpha 9^*$  nAХР.
- 3) Впервые установлено, что активация nAХР и mAХР (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 nAХР и mAХР ноцицептивных нейронов, а также mAХР тучных клеток. Впервые обнаружена предпочтительная экспрессия  $\alpha 7$  nAХР ноцицептивными нейронами, содержащими пептид CGRP, известный медиатор болей при мигрени.
- 4) Установлено, что активация  $\alpha 7$ ,  $\alpha 3\beta 2$  и  $\alpha 6^*$  nAХР 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 nAХР критична для таких механизмов нейропластичности, как нейрогенез во взрослом организме и компенсаторные процессы в nigростриатной системе при моделировании болезни Паркинсона (БП).

Впервые обнаружены функциональные  $\alpha 7$  nAХР на новообразованных нейронах взрослых грызунов. Впервые установлено, что основные компенсаторные изменения экспрессии nAХР в нигростриатной системе происходят на досимптомной стадии в модели БП.

6) Открыты новые низкомолекулярные среднеаффинные «молчащие» агонисты  $\alpha 7$  nAХР природного (6-бромогипафорин) и синтетического (производные хинолина) происхождения, а также антагонисты nAХР 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  $\alpha 7$  nAХР-селективного фармакофора.

7) Доклинические испытания лекарственного препарата на основе синтетического пептида аземиопсина из яда *Azemiops feae*, конкурентного антагониста мышечного nAХР, 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.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи

- 1) Barykin E.P., Garifulina A.I., Kruykova E.V., Spirova E.N., Anashkina A.A., Adzhubei A.A., **Shelukhina I.V.**, Kasheverov I.E., Mitkevich V.A., Kozin S.A., Hollmann M., Tsetlin V.I., Makarov A.A. Isomerization of Asp7 in beta-amyloid enhances inhibition of the  $\alpha 7$  nicotinic receptor and promotes neurotoxicity. *Cells*, 2019. 8(8).
- 2) Spirova E.N., Ivanov I.A., Kasheverov I.E., Kudryavtsev D.S., **Shelukhina I.V.**, Garifulina A.I., Son L.V., Lummis S.C.R., Malca-Garcia G.R., Bussmann R.W., Hennig L., Giannis A., Tsetlin V.I. Curare alkaloids from Matis Dart Poison: Comparison with d-tubocurarine in interactions with nicotinic, 5-HT3 serotonin and GABAA receptors. *PLoS One*, 2019. 14(1):e0210182.
- 3) **Shelukhina I.V.**, Zhmak M.N., Lobanov A.V., Ivanov I.A., Garifulina A.I., Kravchenko I.N., Rasskazova E.A., Salmova M.A., Tukhovskaya E.A., Rykov V.A., Slashcheva G.A., Egorova N.S., Muzyka I.S., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. Azemiopsin, a selective peptide antagonist of muscle nicotinic acetylcholine receptor: preclinical evaluation as a local muscle relaxant. *Toxins (Basel)*, 2018. 10(1).
- 4) Макарова Я.В., Крюкова Е.В., **Шелухина И.В.**, Лебедев Д.С., Андреева Т.В., Рязанцев Д.Ю., Баландин С.В., Овчинникова Т.В., Цетлин В.И., Уткин Ю.Н. Первые рекомбинантные трёхпетельные токсины гадюк: ингибирование мышечных и нейронных никотиновых холинорецепторов. *ДАН*, 2018. 479(6):708-711.
- 5) Durek T., **Shelukhina I.V.**, Tae H.S., Thongyoo P., Spirova E.N., Kudryavtsev D.S., Kasheverov I.E., Faure G., Corringier P.J., Craik D.J., Adams D.J., Tsetlin V.I. Interaction of synthetic human slurp-1 with the nicotinic acetylcholine receptors. *Sci Rep.*, 2017. 7(1):16606.
- 6) **Shelukhina I.**, Spirova E, Kudryavtsev D, Ojomoko L, Werner M, Methfessel C, Hollmann M, Tsetlin V. Calcium imaging with genetically encoded sensor Case12: facile analysis of  $\alpha 7/\alpha 9$  nAChR mutants. *PLoS One*, 2017. 12(8):e0181936.
- 7) Shelukhina I., Mikhailov N., Abushik P., Nurullin L., Nikolsky E.E., Giniatullin R. Cholinergic nociceptive mechanisms in rat meninges and trigeminal ganglia: potential implications for migraine pain. *Front Neurol.*, 2017. 8:163.
- 8) Макарова Я.В., **Шелухина И. В.**, Мукхержи А.К., Кузнецов Д. В., Цетлин В.И., Уткин Ю.Н. Обнаружение нейронных никотиновых холинорецепторов альфа7 человека конъюгатами альфа-нейротоксинов змей с квантовыми точками. *ДАН*, 2017. 475 (1): 103–105.

- 9) Крюкова Е.В., **Шелухина И.В.**, Колачева А.А., Алиева А.Х., Шадрина М.И., Сломинский П.А., Кашеверов И.Е., Уткин Ю.Н., Угрюмов М.В., Цетлин В.И. Возможное участие нейрональных никотиновых ацетилхолиновых рецепторов в компенсаторных механизмах мозга на ранних стадиях болезни Паркинсона. *Биомедицинская химия*, 2017. 63(3): 241-247.
- 10) Kilinc E, Guerrero-Toro C, Zakharov A, Vitale C, Gubert-Olive M, Koroleva K, Timonina A, Luz LL, **Shelukhina I**, Giniatullina R, Tore F, Safronov BV, Giniatullin R. Serotonergic mechanisms of trigeminal meningeal nociception: Implications for migraine pain. *Neuropharmacology*, 2017. 116:160-173.
- 11) Kasheverov IE, Chugunov AO, Kudryavtsev DS, Ivanov IA, Zhmak MN, **Shelukhina IV**, Spirova EN, Tabakmakher VM, Zelepuga EA, Efremov RG, Tsetlin VI. High-affinity  $\alpha$ -conotoxin PnIA analogs designed on the basis of the protein surface topography method. *Sci Rep.*, 2016. 6:36848.
- 12) Кашеверов И. Е., Крюкова Е. В., Кудрявцев Д. С., Иванов И. А., Егорова Н. В., Жмак М. Н., Спирина Е. Н., **Шелухина И. В.**, Одинокоев А. В., Алфимов М. В., Цетлин В. И. Анализ связывающих центров никотиновых рецепторов с помощью синтетических пептидов. *ДАН*, 2016. 470(3):353-356
- 13) Safronova VG, Vulfius CA, **Shelukhina IV**, Mal'tseva VN, Berezhnov AV, Fedotova EI, Miftahova RG, Kryukova EV, Grinevich AA, Tsetlin VI. Nicotinic receptor involvement in regulation of functions of mouse neutrophils from inflammatory site. *Immunobiology*, 2016. 221(7):761-72.
- 14) Manetti D., Bellucci C., Dei S., Teodori E., Varani K., Spirova E., Kudryavtsev D., **Shelukhina I.**, Tsetlin V., Romanelli M. N. New quinoline derivatives as nicotinic receptor modulators. *Eur J Med Chem.*, 2016. 110: 246-258.
- 15) Фауре Г., **Шелухина И. В.**, Поровинска Д., Шулепко М. А., Люкманова Е. Н., Долгих Д. А., Спирина Е. Н., Кашеверов И. Е., Уткин Ю. Н., Корринжер П.-Ж., Цетлин В. И.. Взаимодействие трехпетельных белков из яда змей и из мозга млекопитающих с CYS-петельными рецепторами и их моделями. *ДАН*, 2016. 468 (2): 232–5.
- 16) Malca Garcia G., Hennig L., **Shelukhina I.**, Kudryavtsev D., Bussmann R.W., Tsetlin V., Giannis A. Curare alkaloids: constituents of a Matis dart poison. *J. Natural Products*, 2015. 78(11):2537-44.
- 17) Kudryavtsev DS, **Shelukhina IV**, Son LV, Ojomoko LO, Kryukova EV, Lyukmanova EN, Zhmak MN, Dolgikh DA, Ivanov IA, Kasheverov IE, Starkov VG, Ramerstorfer J, Sieghart W, Tsetlin VI, Utkin YN. Neurotoxins from snake venoms and  $\alpha$ -conotoxin Iml inhibit functionally active ionotropic  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) receptors. *JBC*, 2015. 290(37):22747-58.
- 18) Zakharov A, Vitale C, Kilinc E, Koroleva K, Fayuk D, **Shelukhina I**, Naumenko N, Skorinkin A, Khazipov R and Giniatullin R. Hunting for origins of migraine pain: cluster analysis of spontaneous and capsaicin-induced firing in meningeal trigeminal nerve fibers. *Front. Cell. Neurosci.*, 2015. 9:287.
- 19) **Shelukhina I**, Paddenberg R, Kummer W, Tsetlin V. Functional expression and axonal transport of  $\alpha 7$  nAChRs by peptidergic nociceptors of rat dorsal root ganglion. *Brain Struct Funct.*, 2015. 220:1885–1899.
- 20) Kudryavtsev D, **Shelukhina I**, Vulfius C, Makarieva T, Stonik V, Zhmak M, Ivanov I, Kasheverov I, Utkin Y, Tsetlin V. Natural compounds interacting with nicotinic acetylcholine receptors: from low-molecular weight ones to peptides and proteins. *Toxins (Basel)*, 2015. 7(5):1683-1701.
- 21) John D., **Shelukhina I.**, Yanagawa Y., Deuchars J. and Henderson Z. Functional alpha7 nicotinic receptors are expressed on immature granule cells of the postnatal dentate gyrus. *Brain Res.*, 2015. 1601:15-30.

- 22) Kasheverov I., **Shelukhina I.**, Kudryavtsev D., Makarieva T., Spirova E., Guzii A., Stonik V. and Tsetlin V. 6-Bromohypaphorine from marine nudibranch mollusk *Hermisenda crassicornis* is a specific agonist of human  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor. *Marine Drugs*, 2015. 13(3):1255-66.
- 23) Крюкова Е.В., **Шелухина И.В.**, Козина Е.А., Цетлин В.И., Угрюмов М.В. Экспрессия ацетилхолиновых рецепторов в мозге у мышей на досимптомной стадии паркинсонизма. *ДАН*, 2013. 449 (1):107–109.

### Патенты

- 1) Уткин Ю. Н., Жмак М.Н., Андреева Т. В., Кудрявцев Д.С., Крюкова Е.В., Цетлин В. И., Старков В.Г., **Шелухина И.В.** Пептиды и их производные, взаимодействующие с никотиновым ацетилхолиновым рецептором и пригодные для использования в косметологии против мимических и возрастных морщин. // **Патент РФ**, № 2524428. 21.01.2013.
- 2) Zhmak MN, Utkin YN, Andreeva TV, KudryavtsevDS, Kryukova EV, Tsetlin VI, Kasheverov IE, Starkov VG, **Shelukhina IV.** Peptide inhibitors of nicotinic acetylcholine receptor. 2017, **USA patent** US 20150361137 A1
- 3) Zhmak MN, Utkin YN, Andreeva TV, KudryavtsevDS, Kryukova EV, Tsetlin VI, Kasheverov IE, Starkov VG, **Shelukhina IV.** Peptide inhibitors of nicotinic acetylcholine receptor. 2017, **European patent** EP2945963 (A1) — 2015-11-25

### Тезисы докладов

- 1) **Shelukhina I.**, Kryukova E., Paddenberg R., Kummer W. «Функциональная экспрессия и аксональный транспорт альфа 7 nAChR CGRP-эргическими нейронами спинальных ганглиев взрослых крыс». 38th congress of the Federation of European Biochemical Societies, 6 – 11 июля 2013, Санкт-Петербург. *FEBS Journal*, 2013, 280(1):191. *Устный доклад*.
- 2) **Shelukhina I.** Different physiological functions of  $\alpha 7$  nAChR in neurodegenerative diseases, neurogenesis and nociception. A Russian-German Hirnliga symposium on: “Molecular mechanisms of neurodegeneration”, г. Берлин, Германия, 3 – 5 мая 2014. *Устный доклад*.
- 3) **Shelukhina I.** Identification of alpha 7 nicotinic receptors in nociceptive neurons and their functioning. A Russian-German symposium: “Molecular neurobiology today and tomorrow”. 26 – 29 апреля 2012, г. Москва. *Устный доклад*
- 4) **Shelukhina I.** Nicotinic receptors: from new ligands and new tests to physiological relevance. The fourth biennial German-Russian symposium: “Molecular neurobiology today and tomorrow”. 5 – 9 апреля 2017 г. Москва. *Устный доклад*
- 5) **Shelukhina I.** Nicotinic receptors: from in vitro studies to *Объединенный научный форум Международная научная конференция "XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова" VIII Российский симпозиум "Белки и пептиды" 18 – 22 сентября 2017 г. Москва. Пленарный доклад*

### Монография

Крюкова Е.В., **Шелухина И.В.**, Жмак М.Н. , Осипов А.В., Кудрявцев Д., Оджомоко Л., Кашеверов И.Е., Уткин Ю.Н., Цетлин В.И. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы: физиологические функции и роль в нейродегенеративных процессах. Нейродегенеративные заболевания: от генома к целому организму. Том 2/Ред. М.В. Угрюмова. – Москва: Научный мир, Россия, 2014. – 542-554. ISBN 978-5-91522-401-7.