

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, профессора, главного научного сотрудника
лаборатории нейробиологии и основ развития мозга Федерального
государственного автономного учреждения "Национальный
медицинский исследовательский центр здоровья детей" Министерства
здравоохранения Российской Федерации **Пинелиса Всеволода
Григорьевича** на диссертацию **Шелухиной Ирины Валерьевны**
«Никотиновые и родственные рецепторы нейромедиаторов: механизмы
функциональной активности и новые лиганды»,
представленную на соискание ученой степени доктора химических
наук
по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия».

Актуальность. Диссертационная работа Шелухиной И.В. «Никотиновые и родственные рецепторы нейромедиаторов: механизмы функциональной активности и новые лиганды» является актуальной, прежде всего, потому что, несмотря на интенсивные и многочисленные исследования, а проблеме уже более 100 лет, молекулярные механизмы их функционирования в норме, а особенно в патологии, окончательно не изучены. Хотя не вызывает сомнений обоснованное представление, что никотиновые АЦР (нАЦР) принадлежат к классу пентамерных лиганд-управляемых белков, отвечающих за связывание медиатора (в данном случае ацетилхолина), отсутствует стройная теория их функционирования, многие стадии их молекулярных механизмов не изучены и носят отрывочный характер. Несмотря на предположение, что в основе неврологических, психических, нейродегенеративных, воспалительных и других патологиях (шизофрения, аутизм, эпилепсия, болезни Альцгеймера и Паркинсона, мигрень, миастения, сепсис, ревматоидный артрит и др.) лежит нарушение функционирования Sys-

петельных рецепторов, к которым относятся нАЦР, их специфическая терапия отсутствует. Для большинства данных заболеваний в настоящее время проводится симптоматическое лечение, приводящее к улучшению общего состояния пациента, но не устраняющее причин развития патологии. Поэтому поиск препаратов, непосредственно действующих на Cys-петельные рецепторы, является также актуальным. Несмотря на то, что нАЦР являются важной фармакологической мишенью при указанных выше состояниях, многие аспекты их функциональной активности в организме остаются недостаточно изученными. Например, не так давно был открыт холинергический противовоспалительный рефлекс, опосредованный активацией $\alpha 7$ нАХР макрофагов в ответ на холинергическую нервную сигнализацию. Этот пример взаимодействия нервной и иммунной систем уже успел стать классическим и сейчас появляется все больше подтверждений комплексного характера клеточно-тканевого ответа при холинергической иннервации. Однако все это требует подробной детализации имеющихся научных знаний и обнаружение новых аспектов функциональной роли Cys-петельных рецепторов как в нервной системе, так и за ее пределами. Поэтому выполненное Ириной Валерьевной Шелукиной экспериментальное исследование, посвященное изучению молекулярных механизмов функционирования нАЦР в норме и патологии, является своевременным и актуальным. Таким образом, рецензируемая работа актуальна и направлена на обнаружение новых механизмов функциональной активности Cys-петельных рецепторов в организме, поиск их новых фармакологически-перспективных лигандов и детализацию механизмов лиганд-рецепторных взаимодействий.

Научная значимость, теоретическая и прикладная ценность исследования определяется установлением следующих основных закономерностей:

1. Разработан уникальный комплексный подход с использованием современных биохимических, электрофизиологических, микроскопических, молекулярно-генетических исследований для изучения клеточно-тканевой локализации и функциональных характеристик Cys-петельных рецепторов, сочетающий флуоресцентный и радиолигандный анализ с использованием пептидно-белковых нейротоксинов, а также метод кальциевого имиджинга и электрофизиологию.

2. Впервые установлено ингибирование природных подтипов ГАМКА-рецепторов трехпетельными α -нейротоксинами змей, классическими высокоаффинными конкурентными антагонистами нАХР. Для наиболее эффективного ингибитора ГАМКА-рецепторов, α кобратоксина, подтвержден конкурентный механизм связывания, основанный на ключевой роли положительного заряда его центральной петли, а также обнаружена дополнительная аллостерическая компонента связывания.

3. Для, синтетического трехпетельного белка SLURP-1 человека, структурного аналога α -нейротоксинов змей, впервые установлено предпочтительное ингибирование гетеромерных нАХР.

4. Впервые обнаружено, что холинергическая иннервация, усиливающая болевую сигнализацию в оболочках головного мозга, месте зарождения болей при мигрени, регулирует двухфазным образом специфические защитные реакции нейтрофилов мышей при воспалении, действуя на $\alpha 7$, $\alpha 3\beta 2$ и $\alpha 6^*$ нАХР, а также способствует дифференцировке новообразованных нейронов в гиппокампе грызунов посредством активации $\alpha 7$ нАХР.

5. Впервые выявлены предпочтительная экспрессия и аксональный транспорт $\alpha 7$ nAХР в ноцицептивных нейронах сенсорных ганглиев, иммунопозитивных к пептиду CGRP, одному из основных медиаторов боли при мигрени.

6. Установлено, что активация $\alpha 7$, $\alpha 3\beta 2$ и $\alpha 6^*$ nAХР регулирует двухфазным образом специфическую защитную реакцию нейтрофилов мышцей при воспалении – выработку активных форм кислорода, а также усиливает их клеточную адгезию. Такая функциональная активность nAХР критична для нейрогенеза во взрослом организме и для компенсаторных процессов в nigростриатной системе при моделировании болезни Паркинсона (БП).

7. Открыты новые низкомолекулярные среднеаффинные «молчащие» агонисты $\alpha 7$ nAХР природный (6-бромогипафорин) и синтетический (производные хинолина) происхождения. Также изучены антагонисты nAХР со смешанным механизмом связывания (алкалоиды ВВIQA из яда кураре) более селективные, чем их структурный аналог дтубокурарин. Впервые установлено, что присоединение хинолина к 9-членному гетероциклу является критичной чертой $\alpha 7$ nAХР-селективного фармакофора.

8. 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.

9. Практическая значимость работы состоит в усовершенствовании нейрохимической методологической базы, выяснении новых аспектов роли nAХР и родственных рецепторов нейромедиаторов в патофизиологических процессах, а также открытии и характеристике

свойств их новых фармакологически-перспективных 6 лигандов (в том числе доклинически испытанного недеполяризующего миорелаксанта). Это может в дальнейшем послужить основой для корректировки имеющихся или разработки новых подходов фармакотерапии.

10. Наконец, огромное научно-практическое значение имеют 23 опубликованные статьи в ведущих журналах мира, опубликованная монография и 3 патента, в том числе 2 зарубежные.

Общая характеристика работы. Диссертация Ирины Валерьевны Шелухиной построена по традиционной схеме и состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов, их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 730 наименований. Материалы работы изложены на 244 страницах машинописного текста и хорошо иллюстрированы (55 рисунков и 11 таблиц), что облегчает восприятие материала. Диссертация оформлена в соответствии с требованиями ВАК. Содержание диссертации соответствует специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия»

Организация исследования. Среди предпосылок к проведению продуктивного исследования важнейшими являются: четкое обоснование цели, последовательности задач, выбор наиболее подходящих экспериментальных объектов, разработка комплекса адекватных подходов и методов, позволяющих сопоставление результатов, получаемых в разных сериях экспериментов, и создание набора адекватных инструментов. При исследовании обсуждаемой проблемы инструментами выбора преимущественно являются фармакологические агенты разного происхождения.

Организация и осуществление диссертационной работы полностью отвечает этим требованиям. Подробнее остановлюсь на двух из них – методах и инструментах. Для получения сопоставимых результатов опытов на обширном перечне объектов: нАХР разного субъединичного состава, их «братьев по разуму» в лице, ГАМКа ,

глицинового и 5-HT₃ подтипа серотонинового рецепторов, относящихся к семейству G_q-петельных рецепторов, клеток, принимающих участие в реализации ноцицепции, элементов системы воспаления, иммунных клеток и т.п. в диссертации был применен комплекс, включающий флуоресцентный и радиолигандный анализ, кальциевый имиджинг и электрофизиологический подход. Важным отличием этого комплекса от подобных является применение гетерологически экспрессированного одноволнового белкового кальциевого сенсора Case-12 в сочетании с nAHP, что привело к разумному упрощению протокола эксперимента, за счет проведения временной трансфекции клеток. Это способствовало получению большего по объему экспериментального материала с меньшими временными и материальными затратами. Что же касается набора инструментов, то он поистине уникален. Поскольку в распоряжении диссертанта был целый арсенал змеиных нейротоксинов, часть из которых была впервые выделена и детально апробирована коллективом исследователей ИБХ РАН, к которому принадлежит диссертант, а также хорошо обоснованный выбор агонистов и антагонистов разных подвидов nAHP, натуральных, синтезированных, низкомолекулярных и пептидно-белкового происхождения. Ценным дополнением явилось использование относительно новых аллостерических модуляторов типа PAM, существенно расширивших методические возможности экспериментальной работы с nAHP.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы STATISTICA 7.0 (StatSoft. Inc., США), которая позволила достаточно убедительно проанализировать полученный материал. Нормальность распределения признака в выборке оценивали с использованием критерия Шапиро-Уилка. Статистические различия между данными, соответствующие нормальному распределению, были проанализированы, используя однофакторный дисперсионный анализ

ANOVA с апостериорным тестом Tukey для сопоставления трех и более групп или *T*-Критерием Стьюдента для анализа не более 2-х групп. Статистические различия в данных, имеющих хотя бы в одной из групп распределение, отличное от нормального, были проанализированы с использованием теста Крускала-Уоллиса с *U*-тестом Манна-Уитни с применением поправки Бонферрони для сопоставления трех и более групп или *U*-тестом Манна-Уитни для анализа не более 2-х групп. Критерием статистической значимости был уровень $P < 0,05$.

Задачи исследования. Цель диссертационной работы достаточно полно обозначена в ее названии. А вот в перечне задач диссертант указал необычно много – 7 пунктов.

Задачи диссертации в основном связаны друг с другом их общей целью и что важно для интерпретации результатов общностью примененных методов и подходов, в особенности имевшихся в распоряжении диссертанта молекулярных инструментов. План решения каждой из задач был направлен на поиск пути обретения нового знания по целому ряду аспектов проблемы.

Результаты исследования свидетельствуют о большом объеме проделанной экспериментальной работы, в ходе которой было необходимо освоить много несхожих по природе объектов. Полученные новые сведения органично вписываются и тем самым пополняют современные представления о функциях nАХР. В рамках отзыва трудно подробно прокомментировать все из них. Поэтому я ограничусь лишь кратким перечнем, останавливаясь на наиболее важных деталях.

Первые три экспериментальные главы посвящены разработке методов цито- и гистохимической детекции и анализу аффинности и специфичности *Cys*-петельных рецепторов по отношению к нейротоксинам и их аналогам. Примечательно, что в ходе этой работы

сложился удачный комплекс методов, который включил также модифицированный кальциевый имиджинг и электрофизиологические методы. Он был опробован и доказал свою валидность применительно к поставленным задачам. По существу, изложенные в первых главах результаты экспериментов явились фундаментом всей диссертации. В ходе этого, казалось бы, преимущественно предварительного, но необходимого этапа работы, было сделано несколько очень интересных находок.

Среди них обращает на себя внимание обнаруженное впервые средство к сайту связывания ГАМКа ряда альфа-нейротоксинов, высокоаффинных конкурентных блокаторов некоторых видов nAHP. Получено убедительное свидетельство сродства нейротоксинов к ортостерическому сайту ГАМК-рецептор, т.к. связывание кобратоксина существенно ослаблено конкуренцией со специфическим агонистом ГАМКа рецептора мусциолом. Эта способность ортостерического связывания некоторых нейротоксинов не только с nAHP, но и с другими родственными трехпетельными рецепторами ждет своего дальнейшего расширенного исследования.

Разработанный комплексный подход к исследованию nAHP и полученное новое знание о вариантах их молекулярных возможностей позволили диссертанту перейти к решению намеченных целей по выявлению и более глубокому изучению физиологической и патофизиологической роли nAHP.

Обезболивающая способность лигандов АХР была уже ранее обнаружена и широко обсуждается рядом исследователей, но механизмы этих эффектов остаются не до конца выясненными. Диссертант провел несколько серий экспериментов на разных объектах, чтобы выяснить участие холинергической системы в разных проявлениях ноцицепции. Особо следует отметить оригинальную работу по выявлению эндогенной активности ацетилхолина по

отношению к разным подтипам АХР в мозговых оболочках. Для этого была использована экспериментальная модель мигрени. Анализ механизмов влияния холинергических лигандов на ноцицепцию, проведенный на первичной культуре тройничного ганглия и на спинальных ганглиях позволил выявить экспрессию функционально-активных $\alpha 7$ nАХР и их аксонную локализацию. Совокупность этих новых данных с результатами уточнения молекулярных и клеточных мишеней действия эндогенного АХ позволила предложить новую схему, демонстрирующую роль холинергической передачи в феномене боли, возникающем при мигрени.

Другим патофизиологическим процессом, по поводу которого накапливаются факты, свидетельствующие об участии холинергической системы, является воспаление. С помощью разработанного комплекса методов диссертантом впервые было проведено типирование представителей nАХР, способных модулировать функцию нейтрофилов и получен ряд доказательств, подкрепляющих существующие представления о двойственной природе действия ацетилхолина, возможности индукции непосредственного входа Ca^{2+} при активации nАХР, а также опосредованно путем выброса ионов Ca^{2+} из внутриклеточных депо, активируя metabotropic signal cascade. Существование второго механизма чрезвычайно интересно, его распространенность способна стать предметом дальнейших углубленных исследований.

Перечень новых аспектов физиологической и патофизиологической роли nАХР, которые подверглись исследованию диссертантом с помощью разработанного им подхода, не случаен. При этом их выбор и тщательность разработки соответствующих экспериментов свидетельствует, что автор диссертации хорошо владеет проблемой и умеет ставить цели, достижение которых способно внести новый существенный вклад в пополнение фундаментального знания и

предпосылок к его практическому использованию при создании новых лекарственных средств. Примером этого является изучение участия nAHR при моделировании болезни Паркинсона, в ходе которого были выявлены компенсаторные изменения в уровне экспрессии nAHR в nigrostriатной системе мышей уже на досимптомной стадии развития болезни. Сделан значимый вклад в фармакологию миорелаксантов при изучении компонентов яда кураре разного происхождения и подробном систематическом исследовании действия пептида аземиопсина, выделенного из яда гадюки, который превосходит по ряду своих свойств существующие синтезированные средства и может занять актуальную нишу миорелаксантов со средней продолжительностью действия, востребованных клинической практикой.

Степень обоснованности положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Обширный объем проведенных исследований полностью соответствует уровню диссертации на соискание ученой степени доктора химических наук. Автором в работе использованы современные методы исследования и способы обоснования полученных результатов, выводов и рекомендаций, которые свидетельствуют о высокой степени обоснованности всех положений и выводов диссертационного исследования, выносимых на защиту. Комплекс используемых соискателем методов исследования соответствует поставленным целям и задачам исследовательской работы, а совокупность результатов и выводов органично вытекает из проведенного диссертационного исследования. На основании экспериментальных данных сформулировано семь выводов, в которых суммированы результаты исследований. Выводы диссертационной работы полностью соответствуют цели и задачам исследования, и полностью обоснованы. Принципиальных замечаний нет. Прежде чем задать вопросы, возникшие при чтении работы хотелось бы отметить

досадные вещи: отсутствие в автореферате раздела «Материал и методы исследования», отсутствуют положения, выносимые на защиту.

Знакомство с материалами диссертационной работы И.В. Шелухкиной служит поводом для ряда дискуссионных соображений и вопросов. Их относительно много, что должно восприниматься как достоинство диссертации, как признак новизны и актуальности обнаруженных фактов. Поэтому я ограничусь лишь теми, которые имеют непосредственное отношение к вкладу, который эта работа вносит в современное состояние проблемы nAHP. Прежде всего, это роль ионов кальция на всех этапах активации nAHP и ее следствий. Она многообразна и далеко еще не все ее аспекты детально изучены. Самым быстрым и эффективным механизмом повышения концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле является их вход через открываемые трансмембранные катионные каналы. К их числу относится и семейство nAHP, управляемых ацетилхолином. Сразу возникает несколько связанных между собой вопросов к диссертанту:

1. Уровень удельной кальциевой проницаемости у каналов разных nAHP не одинаков. У $\alpha 7$ nAHP он максимален, а какова зависимость кальциевого сигнала, вызванного ацетилхолином или никотином при работе с разными nAHP, (ведь существует не менее 17 субъединиц nAHP, способных участвовать в формировании пентамера)?

2. Мне кажется очень важным следующий вопрос. Можно ли, используя кальциевой имиджинг, оценить вход Ca^{2+} через потенциал зависимые Ca^{2+} каналы и зависит ли этот вход от степени деполяризации плазматической мембраны?

3. Используя фармакологический анализ, можно ли оценить вклад в величину Ca^{2+} сигнала эндоплазматический ретикулум и митохондрии?

4. Перспективно ли применение сайт-направленного мутагенеза по отношению к ионному фильтру канала $\alpha 7$ nAХР для существенного снижения доли кальция в трансмембранном токе? Такие мутированные виды nAХР уже существуют и начинается их успешное использование (см. Colon-Saez and Jakel, PflugersArch, 2014; King et al., MolPharm, 2018).

5. Помимо инотропного эффекта агонистов nAЦР возможен ли метаботропный эффект ряда соединений, связанных с участием ГТФ-связывающего белка и IP3?

6. С чем связана гетерогенность Ca^{2+} сигнала в нейтрофилах: отвечают только 30% клеток? Выявлена ли связь степени воспаления с Ca^{2+} ?

7. Автор впервые обнаружила средство к сайту связывания ГАМКа ряда альфа-нейротоксинов, высокоаффинных конкурентных блокаторов некоторых видов nAХР. Каково физиологическое значение этого средства?

8. Автор изучала проблемы нейрогенеза нейронов взрослых животных, а какова роль в этом стволовых клеток, имеющих в мозгу взрослых животных?

Хотя вопросов много, но этим подчеркивается лишь сложность проведенной диссертантом работы. Становится очевидным, что диссертант внес существенный вклад в решение проблемы. Остается только пожелать успеха при продолжении продуктивных исследований, например, с использованием новых лигандов.

На основании всего выше сказанного, я высоко оцениваю большой, прекрасно организованный, плодотворный диссертационный труд, и я могу перейти к обязательной формуле завершения отзыва.

Диссертация Шелухиной Ирины Валерьевны является законченным научным исследованием, соответствующим всем критериям, в том числе п. 9, "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени доктора химических наук по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия».

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук,
профессор, г.н.с.

лаборатории нейробиологии и
основ развития мозга мозга

ФГАУ "НМИЦ здоровья детей" Минздрава России,

Тел:+7(916)686-77-24, pinelis@mail.ru  Пинелис В.Г.

Подпись доктора медицинских наук, профессора Пинелиса Всеволода Григорьевича «удостоверяю».

Ученый секретарь ФГАУ

"НМИЦ здоровья детей"

Минздрава России

ФГАУ "НМИЦ здоровья детей" Минздрава России

119296, Москва, Томоносовский просп., 2, стр.1

Тел +7(499) 134-30-83

Официальный сайт: <http://nczd.ru>, адрес электронной почты:

director@nczd.ru

19.08.2020 г.