

УТВЕРЖДАЮ

Директор федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук
д.х.н., профессор Курочкин Илья Николаевич

От «14» февраля 2020 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ
на диссертационную работу 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»

В настоящее время вопросы нейрохимии и нейробиологии приобрели особую актуальность в связи с повышенным интересом мирового научного сообщества к исследованию когнитивных функций человека. В этой связи глубокое понимание аспектов функционирования рецепторов нейромедиаторов приобрело особое значение в силу их ключевой роли в физиологических и патофизиологических процессах, протекающих в головном мозге. Семейство Cys-петельных рецепторов, объединяющее никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR), рецепторы γ -аминомасляной кислоты (ГАМК), глицина и серотонина (подтип 5-HT₃), можно назвать эталонными ионотропными рецепторами нейромедиаторов. Эти рецепторы объединяет высокомолекулярное пространственное строение, а также схожий механизм функционирования. Так, в ответ на связывание специфического агониста с рецептором происходят конформационные перестройки, ведущие к открытию поры ионного канала и возникновению трансмембранного тока. Во многом именно Cys-петельные рецепторы (в наибольшей мере nAChR) послужили моделью для открытия молекулярных основ функционирования ионных каналов и изучения физиологии синаптической нервной передачи. Однако до настоящего времени интерес к Cys-петельным рецепторам не угасает из-за сложности молекулярных механизмов их активности, широчайшего распространения в организме и многообразия присущих им лиганд-рецепторных взаимодействий. Они остаются одним из основных объектов фундаментальных исследований в области нейрохимии и

нейробиологии. Дисфункцию Cys-петельных рецепторов связывают с целым спектром патологий не только неврологического происхождения, но также и воспалительной природы, т. к. паттерн их экспрессии не ограничивается структурами нервной системы, но включает иммунную систему, клетки эпителия и др. Таким образом, детализация механизмов функционирования Cys-петельных рецепторов и характерных для них лиганд-рецепторных взаимодействий наряду с обнаружением их новых фармакологически-перспективных лигандов приобретает принципиальное значение как для фундаментальных исследований, так и для выполнения практических задач. Все вышесказанное обосновывает актуальность предпринятой диссертационной работы.

В качестве цели настоящего исследования была анонсирована характеристика новых аспектов функциональной активности никотиновых и родственных рецепторов нейромедиаторов в процессах нейропластичности, ноцицепции и воспаления, а также деталей молекулярных механизмов узнавания ими лигандов различной природы. Задачами представленной работы стали 1) разработка комплексного подхода для изучения клеточно-тканевой локализации и функциональных характеристик Cys-петельных рецепторов, 2) определение селективности, механизма связывания и аффинности ряда трехпетельных белков в отношении Cys-петельных рецепторов и их моделей; 3) изучение ноцицептивных механизмов с участием холинергической системы; 4) исследование механизмов холинергической регуляции активности иммунных клеток на примере нейтрофилов; 5) анализ роли nAChR в механизмах нейропластичности взрослого мозга грызунов в физиологическом состоянии и при моделировании патологии; 6) поиск новых низкомолекулярных лигандов nAChR и определение специфичности, аффинности, кинетики, механизма и других особенностей их связывания с рецепторами; 7) доклинические исследования эффективности и безопасности лекарственного средства на основе полипептида аземиопсина в качестве миорелаксанта. Для выполнения поставленных задач применялся целый спектр *in silico*, *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* методик, которые весьма подробно описаны в соответствующем разделе диссертационной работы. В разделе Материалы указаны источники как коммерчески-доступных реактивов, так и лигандов и плазмидных конструкций, полученных лично автором или предоставленных коллегами из российских и зарубежных научных институтов. Таким образом, данная диссертационная работа отличается весьма четко сформулированными задачами, для выполнения которых автор предложил адекватные современные методы.

Работа построена по классической схеме. Она состоит из введения, в котором изложены основные цели и задачи работы, литературного обзора, раздела материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, благодарностей и списка

цитированной литературы, включающего 730 наименований. Диссертационная работа изложена на 244 страницах машинописного текста и включает 55 рисунков и 11 таблиц.

Фундаментальная значимость работы неоспорима, т.к. были получены новые знания о холинергической регуляции процессов ноцицепции (рецепции боли) и процессов нейропластичности мозга в норме и при патологии, а также о холинергической нейроиммунной сигнализации. Также была получена новая информация о селективности, аффинности и механизме связывания трехпетельных белковых и низкомолекулярных кураре-подобных ингибиторов Cys-петельных рецепторов, а также о строении фармакофора низкомолекулярных агонистов и антагонистов nAХР. Практическая ценность работы также не вызывает сомнения, т.к. автору удалось разработать новый комплексный инструментальный метод, выявить новые потенциальные возможности для проведения направленной фармакотерапии при ряде патологических состояний, а также обнаружить ряд новых фармакологически-перспективных лигандов Cys-петельных рецепторов.

Раздел Результаты и обсуждение диссертационной работы разделен на 8 основных глав, где приведены полученные экспериментальные данные и подробно описана их научная значимость для соответствующей области исследований. Первая глава посвящена разработке комплексного подхода для изучения клеточно-тканевой локализации и функциональных характеристик Cys-петельных рецепторов. Подробно описана эволюция применяемого комбинаторного подхода в ходе проведения диссертационного исследования. Автору удалось разработать весьма ёмкий подход, включающий флуоресцентный и радиолигандный анализ с использованием пептидно-белковых нейротоксинов, а также метод кальциевого имиджинга и электрофизиологию.

В следующих двух главах Результатов и обсуждения приводятся новые данные о различиях в специфичности, аффинности и механизме связывания трехпетельных белковых ингибиторов с разными Cys-петельными рецепторами и их моделями. Сравниваются свойства трехпетельных α -нейротоксинов змей разных классов (длинных, коротких и «необычных» α -нейротоксинов), а также родственных им трехпетельных белков семейства Lуб на примере синтетического белка человека SLURP-1. В ходе проведения диссертационной работы удалось обнаружить новую молекулярную мишень (природные ГАМК_A-рецепторы) трехпетельных α -нейротоксинов, широко известных конкурентных антагонистов nAХР. Для этой молекулярной мишени показана возможность ингибирования по смешанному конкурентному/неконкурентному типу. Также весьма интересен вывод, что в отношении неклассических молекулярных мишеней трехпетельные токсины способны проявлять гораздо бóльшую непредсказуемость

действия, чем в отношении nAHP. Спектр молекулярных мишеней, аффинность и механизм действия структурно-подобных α -нейротоксинов трехпетельных белков семейства Lуб заметно отличается. Изучаемый в работе синтетический SLURP-1 предпочтительно ингибировал гетеромерные nAHP, что совершенно не характерно для α -нейротоксинов. Для гомомерных nAHP, основной мишени ряда α -нейротоксинов, SLURP-1 оказался неконкурентным аллостерическим негативным модулятором.

Следующие три главы посвящены изучению новых аспектов функциональной роли nAHP в организме при ноцицепции, воспалении и процессах нейропластичности головного мозга, соответственно. В диссертационной работе довольно подробно раскрыта такая малоизученная область нейробиологии как роль холинергической иннервации оболочек головного мозга, основного места зарождения болей при мигрени. Автором получено довольно много нового экспериментального материала, на основании которого с привлечением некоторых известных данных удалось построить логичную модель функционирования парасимпатической нервной системы оболочек головного мозга при ноцицепции (рецепции боли).

В последнее время при изучении патогенеза целого ряда неврологических и психических заболеваний наблюдается тенденция подробного исследования роли микроокружения нервных клеток, в частности, при развитии воспалительных процессов. В этой связи особую актуальность приобрели работы, раскрывающие детали функционирования рецепторов нейромедиаторов, расположенных на иммунных клетках. В представленной диссертационной работе продемонстрировано, что активация поверхностных nAHP способствует усилению специфических защитных реакций нейтрофилов. Ингибирование (или десенситизация) nAHP приводит к обратному эффекту. Оба наблюдаемых эффекта потенциально клинически значимы при иммуносупрессивных/иммунодефицитных состояниях или при чрезмерной воспалительной реакции, соответственно.

С каждым годом появляется все больше информации о регенеративных и компенсаторных возможностях головного мозга человека, на которые должна быть направлена современная фармакотерапия при неврологических, психических и нейродегенеративных заболеваниях. Диссертант в своей работе обнаружила новые фармакологически-значимые молекулярные мишени в головном мозге, а именно $\alpha 7$ nAHP, вовлеченный в процесс развития новообразованных нейронов гиппокампа, а также $\alpha 7$ и $\alpha 4$ -содержащие nAHP, участвующие в компенсаторных механизмах мозга при моделировании досимптомной стадии болезни Паркинсона. Можно резюмировать, что

диссертант доказала клиническую значимость регуляции активности nAHP на примере собственных исследований в совокупности с литературными данными.

Однако диссертационная работа не ограничивается констатацией этого факта, но также предоставляет новые инструменты для подобных модулирующих воздействий на nAHP. С фармакологической точки зрения открытые в работе низкомолекулярные антагонисты и «молчащие» агонисты nAHP имеют несомненный потенциал как прототипы миорелаксирующих и противовоспалительных лекарственных средств, соответственно. Это становится еще более очевидным при прочтении завершающей главы Результаты и обсуждения, где описаны успешно проведенные доклинические испытания нового недеполяризующего миорелаксанта пептидной природы, который может быть рекомендован для дальнейших клинических испытаний. С фундаментальной точки зрения интереса заслуживают содержащиеся в двух последних главах выводы о неизвестных ранее чертах nAHP-селективного фармакофора.

Работа прекрасно иллюстрирована и документирована. В тексте практически нет опечаток и неточностей, однако по мере рецензирования данной работы возник ряд замечаний и вопросов:

1) Одним из прикладных результатов диссертационного исследования является разработка варианта кальциевого имиджинга с одноволновым флуоресцентным белковым сенсором для скрининга взаимодействий nAHP с лигандами. Вероятно, разработанный метод мог бы стать еще более простым и быстрым при получении стабильной клеточной линии, экспрессирующей кальциевый сенсор и соответствующий подтип nAHP. Проводились ли в рамках диссертационной работы попытки выведения подобной культуры клеток?

2) В разделе диссертации «Функциональная активность nAHP в организме. Ноцицепция» выявлено несколько аспектов взаимного влияния функциональной активности nAHP и нейропептида CGRP при ноцицепции, рецепции болевых стимулов. Так, в условиях повышенного содержания CGRP в оболочках головного мозга эндогенный ацетилхолин усиливал болевую (ноцицептивную) сигнализацию. Также была обнаружена предпочтительная функциональная экспрессия $\alpha 7$ nAHP CGRP-ергическими ноцицептивными нейронами, а затем проанализировано влияние агонистов и антагонистов nAHP на выброс CGRP этими нейронами как в первичной культуре, так и в *ex vivo* препарате чувствительных ганглиев. Однако в тексте диссертации не обсуждается известное прямое воздействие нейропептида CGRP на nAHP. Как согласуются полученные данные с этим известным эффектом CGRP?

3) В диссертационной работе обнаружено, что активация парасимпатической холинергической нервной системы в оболочках головного мозга выражается в усилении частоты болевых сигналов, воспринимаемых тройничным нервом. Установлена вовлеченность никотиновых и мускариновых АХР, расположенных на ноцицептивных нервных и иммунных клетках. На основании полученных данных сделан вывод о важности холинергической нервной передачи в патогенезе мигрени. Хотя довольно подробно изучен нейрохимический профиль экспрессии $\alpha 7$ nAХР ноцицептивными нейронами, однако не проведено определения подтипов nAХР и mAХР, вовлеченных в наблюдаемый проноцицептивный эффект холинергических агонистов в оболочках головного мозга. Позволяют ли полученные результаты в совокупности с литературными данными выявить наиболее важные для этого процесса подтипы nAХР и mAХР?

4) В ходе проведения диссертационной работы было установлено, что наиболее выраженное ингибиторное действие химически синтезированный трехпетельный белок человека SLURP-1 оказывает на гетеромерный nAХР состава $\alpha 3\beta 4$, но не на другой широко распространенный подтип $\alpha 4\beta 2$. Однако в тексте диссертации не обсуждается функциональное значение такого дифференцированного ингибиторного действия SLURP-1. Также остается неясным, позволяют ли полученные результаты судить о молекулярном механизме этого взаимодействия. Дополнительно возникает вопрос о функциональном значении выявленного негативного модулирующего действия SLURP-1 на $\alpha 9\alpha 10$ nAХР, что в недостаточной мере обсуждено в тексте диссертации.

5) Проводились ли в рамках представленной работы попытки закристаллизовать комплекс никотинового ацетилхолинового рецептора или других рецепторов с какими-то из обнаруженных лигандов?

На основании всего вышеизложенного можно сделать вывод, что диссертация Шелухиной И.В. представляет собой завершённую научно-исследовательскую работу на актуальную тему. Новые научные результаты, полученные диссертантом, вносят существенный вклад в развитие не только биоорганической химии, но и молекулярной биологии, нейрохимии, нейробиологии и медицины. Фундаментальные результаты работы можно рекомендовать для использования в научных исследованиях в следующих организациях: на Биологическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова, в Институте биологии гена РАН, в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, в Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова, Институте высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Институте цитологии РАН, НИИФХБ им. А.Н. Белозерского, Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН и др. Практическая значимость

данной работы также неоспорима. Новые фармакологически-перспективные агонисты и антагонисты nAHP можно рекомендовать в качестве исходной субстанции для получения лекарственных средств и проведения соответствующих доклинических и клинических испытаний их эффективности и безопасности в следующих организациях: Российском национальном исследовательском медицинском университете имени Н.И. Пирогова, Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первом Московском государственном медицинском университете имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институте фундаментальной медицины федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и др.

Выводы абсолютно доказаны. Автореферат соответствует основному тексту диссертации. Работа хорошо представлена в периодической научной печати. Основные результаты диссертации опубликованы в 23 статьях в зарубежных и российских рецензируемых журналах, получено 3 патента и опубликована монография. Работа была представлена автором на многих российских и международных конференциях. Таким образом, диссертационная работа Шелухиной Ирины Валерьевны представляет собой законченное научно-квалификационное исследование и соответствует всем критериям (в частности, п.9), установленным "Положением 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».

Отзыв рассмотрен и одобрен на семинаре лаборатории процессов фотосенсибилизации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН) (протокол № 2 от 14 февраля 2020 г.).

Доктор химических наук,
Профессор, заведующий лабораторией
фотосенсибилизации ИБХФ РАН
Кузьмин Владимир Александрович

Подпись Кузьмина Владимира Александровича
заверяю, ученый секретарь ИБХФ РАН, к.б.н. С.И. Скалацкая
« 14 » февраля 2020 г.

Адрес: 119334, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4
Тел. (495) 939-7439, e-mail: ibcp@sky.chph.ras.ru

