

ОТЗЫВ

официального оппонента

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»

Рецепторы, располагающиеся в клеточной мембране, ответственны за диалог клетки с ее окружением. Именно благодаря таким белковым комплексам, зачастую весьма сложно организованным, клетки способны должным образом реагировать на внешние стимулы. Но если для большинства клеток внешнее воздействие приводит к локальному ответу, то рецепция нейромедиаторов, лежащая в основе нервной передачи, позволяет передавать информацию на существенные расстояния к различным клеткам, тканям и органам. Зачастую нервная клетка в один и тот же временной интервал получает целый ряд противоположных внешних сигналов, что подразумевает наличие множества сложноорганизованных и высокоспецифичных рецепторов на ее поверхности. Выделяют ионотропные и метаботропные рецепторы нейромедиаторов. Ионотропные рецепторы также называют лиганд-управляемыми ионными каналами, перенос ионов через которые изменяет мембранный потенциал клетки, выражающийся в дальнейшем распространении или торможении нервной передачи. От правильного понимания механизмов функционирования этих рецепторов напрямую зависит наша способность терапевтического воздействия на них, что необходимо при ряде заболеваний, затрагивающих нервную систему. В настоящее время удастся облегчить состояние пациентов, страдающих различными нейродегенеративными и психическими заболеваниями, но пока мы далеки от понимания и устранения причин данных патологий. В этой связи представленная диссертационная работа, посвященная изучению никотиновых и родственных рецепторов нейромедиаторов, актуальна и с фундаментальной, и с прикладной точек зрения. Диссертационную работу можно назвать многоступенчатым исследованием механизмов функциональной активности рецепторов нейромедиаторов на разных уровнях организации жизни: молекулярном, клеточном, тканевом, органном и организменном. В данном исследовании выявлены новые аспекты физиологического и патофизиологического функционирования рецепторов нейромедиаторов при рецепции

боли, воспалении и нейропластичности в норме и при патологии. Это подразумевает возможность новых терапевтических воздействий на рецепторы при изученных состояниях (болевых ощущениях, мигрени, остром воспалении и болезни Паркинсона). Также в диссертации открыты новые агонисты и антагонисты рецепторов нейромедиаторов, перспективные как миорелаксанты, противовоспалительные и обезболивающие агенты. Все вышесказанное подчеркивает актуальность, целесообразность и новизну проделанного научного исследования.

Диссертационная работа скомпонована традиционным образом. Она состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, и списка цитируемой литературы. Диссертационная работа изложена на 244 страницах машинописного текста и содержит 55 рисунков и 11 таблиц. Во введении излагается актуальность предпринятого научного исследования, а также цель и задачи работы. Целью диссертационной работы стало выявление и характеристика 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. Задачи представленной работы можно условно разделить на фундаментальные (2 – 6 задачи) и прикладные (1 и 7 задачи). Фундаментальные задачи направлены на изучение механизмов холинергической регуляции ряда процессов в организме, а также на изучение свойств лигандов ионотропных G_α-петельных рецепторов. Прикладными задачами стали разработка нового методического подхода и доклинические испытания пептидного миорелаксанта. Отдельно хочется отметить широту и разноплановость методической базы диссертационной работы, включающей *in silico*, *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* методы. Использование такого широкого набора взаимодополняющих методик положительно сказалось на достоверности полученных результатов.

Обзор литературных данных охватывает разнообразные характеристики никотиновых и родственных рецепторов нейромедиаторов, выделяемых в семейство G_α-петельных рецепторов. Рассмотрены консервативные и индивидуальные черты строения этих пентамерных белковых ионных каналов на примере различных представителей этого семейства. Подробно описаны орто- и аллостерические участки связывания лигандов. В представленном обзоре нашли отражение последние исследования кристаллических структур G_α-петельных рецепторов, изменившие представление о конформационных перестройках в структуре

рецептора, происходящих при связывании лиганда и открытии ионного канала. Отдельная глава посвящена функционированию никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (нАХР) на молекулярном уровне, где подробно описаны современные модели перехода этих белковых комплексов между различными конформационными состояниями. Далее ряд глав описывает распространение, особенности строения и связь с заболеваниями различных подтипов нАХР, что обосновывает актуальность диссертационного исследования. Также большой материал собран о лигандах нАХР: агонистах, антагонистах и модуляторах. Приведена их подробная классификация с конкретными примерами применения описываемых соединений. Можно заключить, что проведена внушительная работа по обобщению современных литературных данных, с разной стороны раскрывающих функциональную активность Сус-петельных рецепторов. Несмотря на внушительный объем процитированной литературы (730 источников) обзор не является перегруженным и помогает читателю понять новизну результатов диссертационной работы.

Основные фундаментальные результаты диссертационной работы можно условно разделить на две большие группы: результаты, раскрывающие новые аспекты функциональной активности Сус-петельных рецепторов в организме, и результаты, описывающие ранее неизвестные детали лиганд-рецепторных взаимодействий. Логичным завершающим прикладным этапом изучения ряда новых лигандов Сус-петельных рецепторов является проведенное доклиническое исследование безопасности и эффективности нового пептидного миорелаксанта. Другим прикладным результатом диссертационного исследования является разработка нового комплексного методического подхода для проведения подобных работ.

В диссертационной работе функциональная роль никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (нАХР) изучалась при ноцицепции (рецепции боли), процессах нейропластичности и остром воспалении. Автору удалось органично восполнить имеющиеся пробелы в наших научных знаниях в этих областях. Так, широко известен факт влияния холинергических агентов на процесс рецепции боли. При этом обезболивающий или проноцицептивный эффект лиганда нАХР зависит от природы соединения, его действия на рецептор, варианта его введения в организм и типа болевых ощущений. В этой связи имеющиеся научные данные чаще всего весьма разрозненны и противоречивы. Поэтому столь ценным результатом данной диссертационной работы стало выстраивание целостной картины влияния парасимпатической нервной системы, холинергической по своей природе, на

ноцицепцию в оболочках головного мозга, основном месте зарождения боли при мигрени.

Среди многих процессов нейропластичности мозга, в которых задействованы холинорецепторы, автор выбрала для изучения такие практически неизученные области как нейрогенез во взрослом организме и компенсаторные механизмы мозга на досимптомной стадии болезни Паркинсона. Ей удалось не только показать функциональную активность nAChR на специфических нервных клетках, вовлеченных в эти процессы, но и проследить временную зависимость этой активности от возраста грызунов и тяжести стадии заболевания, соответственно. На основании полученных данных делается вывод о критичности нормального функционирования nAChR для изучаемых процессов нейропластичности. Стоит отметить, что уникальность досимптомной стадии болезни Паркинсона состоит в том, что в этот момент происходит много компенсаторных изменений, активируя которые можно добиться желаемого длительного терапевтического эффекта, которого пока не удается добиться имеющимися фармакотерапевтическими подходами. Поэтому столь важно изучать потенциальные молекулярные мишени для разработки подобной терапии. Из диссертационного исследования становится ясным, что одними из подобных мишеней могут служить наиболее распространенные в головном мозге подтипы nAChR.

Роль nAChR в воспалительных процессах, пожалуй, является наиболее молодой и бурно развивающейся из перечисленных областей знаний. Например, открытие холинергического противовоспалительного эффекта, опосредованного активацией $\alpha 7$ nAChR макрофагов, серьезно расширило наши знания о нейроиммунной сигнализации. В диссертационной работе изучалось влияние деятельности nAChR на защитные функции таких мощных эффекторов воспалительной реакции как нейтрофилы. Особое внимание привлекает двухфазный эффект агонистов nAChR на продукцию активных форм кислорода нейтрофилами. Это подразумевает возможность очень тонкой регуляции клеточных механизмов нейтрофилов холинергическими агентами.

Ряд глав диссертационной работы посвящен выяснению ранее неизвестных деталей лиганд-рецепторных взаимодействий, присущих Cys-петельным рецепторам. Проведены исследования действия как низкомолекулярных, так и пептидно-белковых лигандов этих рецепторов. В целом, из результатов диссертационной работы и приведенных литературных данных можно сделать вывод, что большинство подобных лигандов в той или иной степени модулируют действие широкой панели Cys-петельных рецепторов. Поэтому особенно важной выглядит проверка их активности

для набора родственных рецепторов, что было успешно проведено на всех соответствующих этапах выполнения диссертационной работы. Например, было выяснено, что трехпетельные α -нейротоксины из ядов змей не являются столь высокоселективными антагонистами nAHP, как это считалось ранее. В диссертационной работе они успешно ингибировали ряд подтипов ГАМК_A-рецепторов, другого близкородственного тормозного рецептора нейромедиатора (гамма-аминомасляной кислоты). С ГАМК_A-рецепторами они связывались с меньшей аффинностью и по необычному для них конкурентному/неконкурентному механизму. Неконкурентная компонента связывания оказалась основной при действии трехпетельного белка SLURP1 человека в отношении $\alpha 7$ и $\alpha 9\alpha 10$ nAHP как негативного аллостерического модулятора. Основной же мишенью его ингибиторного действия, по всей видимости, являются $\alpha 3\beta 4$ и другие гетеропентамерные nAHP. Таким образом, он также отличается широким спектром молекулярных мишеней в организме. В диссертационной работе был открыт и охарактеризован ряд новых низкомолекулярных ингибиторов ряда подтипов nAHP, алкалоидов из яда кураре племени Матис. Обнаружено, что они также оказывали антагонистическое действие на ГАМК_A-рецепторы и 5HT₃ рецепторы серотонина. Однако их аффинность к этим подтипам рецепторов была значительно ниже, чем у их известного структурного аналога – *d*-тубокурарина. Соответственно, эти новые аналоги были гораздо более селективными, чем *d*-тубокурарин в отношении своей основной молекулярной мишени - мышечному рецептору nAHP, что подразумевает их улучшенные фармакологические перспективы в качестве недеполяризующих миорелаксантов. В рамках диссертационной работы для проведения доклинических испытаний в качестве недеполяризующего миорелаксанта был выбран уникальный линейный пептид аземиопсин из яда *Azemiops feae*. Как многие высокоспецифичные пептидные лиганды, он превосходил клинически применяемые низкомолекулярные миорелаксанты по селективности действия, а также по эффективности и безопасности действия при применении в терапевтических дозах у мышей.

Можно заключить, что представленная диссертационная работа является комплексным фундаментально-прикладным научным трудом. Новизна, актуальность и обоснованность полученных результатов и выводов несомненны, что подтверждается внушительным списком публикаций по теме диссертации в таких высокорейтинговых рецензируемых научных журналах как *Cells*, *PlosOne*, *Sci. Rep*, *Neuropharmacology*, *JBC*, *Brain Struct Funct* и др. Кроме того приведены полученные российские и

зарубежные патенты (Патент РФ, USA patent, European patent), а также избранные тезисы устных и пленарных докладов на симпозиумах. Часть полученных результатов также опубликована как глава в книге, посвященной нейродегенеративным заболеваниям. Как любое научное исследование, диссертационная работа Шелухиной И.В. вызывает ряд вопросов и замечаний, приведенных далее.

1) В диссертационной работе для α -кобратоксина, классического конкурентного антагониста nAHP, не только обнаружена новая природная мишень действия – ГАМКА-рецепторы, но также показан нетипичный механизм связывания с этой новой мишенью. Связывание осуществляется по конкурентному механизму, но также присутствует и неконкурентная компонента. В случае неконкурентного механизма предполагается посадка токсина в какой-то отличный от ортостерического сайт связывания лигандов?

2) Автор указывает, что при изучении эндогенной холинергической системы мозговых оболочек было обнаружено наличие ацетилхолин- и бутирилхолинэстераз в нервных волокнах твердой мозговой оболочки, окружающих кровеносные сосуды, а также достаточно редко в диффузно-расположенных аксонах. Однако в диссертации недостаточно подробно поясняется физиологическое значение выявленной локализации этих ферментов.

3) При обсуждении полученных данных об аксональном транспорте альфа 7 nAHP чувствительными нейронами спинномозговых ганглиев автор приводит много анатомической терминологии о строении спинного мозга, его корешков и т.п. Также приводятся данные о совместной экспрессии альфа 7 nAHP и нейропептида CGRP в нервных волокнах. В данном случае представляется целесообразным приведение общей схемы, наглядно демонстрирующей полученные результаты.

4) Фармакокинетика и миорелаксанта́ный эффект лекарственного средства на основе аземиопсина изучалась при его внутривенном и внутримышечном введении мышам. Однако автор затрудняется отнести этот препарат к какому-то определенному классу недеполяризующих миорелаксантов, т.к. классификация разработана в соответствии с продолжительностью их действия при введении человеку. Исходя из имеющихся данных, можно ли приблизительно оценить, какова будет продолжительность действия этого пептидного миорелаксанта для человека? И, соответственно, какие перспективы его применения могут быть ?

Перечисленные замечания не умаляют достоинств проведенной работы, а скорее подчеркивают, что серьезный научный труд должен порождать все новые вопросы. Содержание диссертационной работы достаточно полно изложено в автореферате и приведенном списке публикаций.

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».

Заведующий лабораторией молекулярных основ действия физиологически активных соединений
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта
Российской академии наук (ИМБ РАН),
д.х.н., академик РАН

119991, Россия, г. Москва,
ул. Вавилова, д. 32
Тел. (499)135-23-11
E-mail: kochet@eimb.ru

Кочетков Сергей Николаевич

Подпись д.х.н., академика РАН Кочеткова С. Н.
«Удостоверяю»
Ученый секретарь ФГБУН ИМБ РАН
к.в.н. Бочаров А. А.

21 февраля 2020 г.

