

## 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»

Работа Шелухиной И.В. посвящена изучению никотиновых и родственных рецепторов нейромедиаторов. Интерес к этой тематике предсказуемо высок, т.к. рецепция нейромедиаторов лежит в основе нервной передачи, определяющей физиологическое функционирование нервной системы. Актуальность изучаемой проблемы хорошо иллюстрируется следующим примером: еще в 1905 году Ленгли обнаружил в поперечно-полосатых мышцах никотин-зависимые рецепторы нервных импульсов, но несмотря на усилия многочисленных исследователей только в 2016 году впервые была установлена кристаллическая структура никотинового ацетилхолинового рецептора. Во многом это обусловлено сложным трансмембранным пентамерным строением рецепторного комплекса. В 2014 – 2016 годах также были опубликованы кристаллические структуры родственных никотиновым рецепторов серотонина, гамма-аминомасляной кислоты и глицина. Все эти рецепторы объединяют в семейство Cys-петельных рецепторов на основании высококонсервативного пространственного строения. Сложность строения и функционирования обеспечивает множественные возможности воздействия на данные рецепторы, что делает их весьма привлекательной терапевтической молекулярной мишенью. В связи с тем, что Cys-петельные рецепторы задействованы в различных заболеваниях неврологического характера, воспалительной природы, мышечных дистрофиях и других патологиях, в последние годы усилия многих лабораторий и фармацевтических компаний направлены на поиск их специфических агонистов, антагонистов и модуляторов. Также весьма активно изучаются детали функционирования этих рецепторов как сложных пентамерных трансмембранных белковых комплексов и механизмы воздействия на них различных соединений. Таким образом, весьма актуальной является выполненная диссертационная работа, в которой органично слились анализ функциональной активности Cys-петельных рецепторов в ряде физиологических и патофизиологических процессов в организме, а также поиск новых и пересмотр

действия известных лигандов этих рецепторов (определение их целевой молекулярной мишени, механизма и количественных параметров действия). Отдельно стоит отметить удачное сочетание проведенных в работе фундаментальных и прикладных исследований. Наиболее ярким примером служит доклиническое исследование недеполяризующего миорелаксанта на основе пептида аземиопсина из яда *Azemiops feae*. Для этого препарата не только подробно изучен молекулярный механизм ингибирования целевого мышечного и ряда родственных рецепторов *in vitro*, но также проведены все необходимые этапы полноценного доклинического исследования лекарственного средства, детализирующие его поведение в организме.

Работа является оригинальной и содержательной в научном отношении. Ее новизна подчеркивается внушительным списком публикаций в высокорейтинговых международных журналах. Диссертационная работа удачно скомпонована, хорошо структурирована и написана хорошим литературным языком. Работу отличают четко сформулированные цели и задачи исследования, изложенные во введении, за введением традиционно следует литературный обзор, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы.

Заявленная цель диссертационной 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 было поставлено 7 дополняющих друг друга исследовательских задач и использован внушительный набор методов. Разнообразие методов можно проиллюстрировать на примере методик для оценки функциональной активности  $\alpha_5\beta_1$ -петельных рецепторов: в диссертационной работе применялось 5 различных методик кальциевого имиджинга и 4 методики электрофизиологического анализа. Следует отметить, что автор очень критично подходит к постановке контрольных экспериментов, что особенно важно при работе с неоднородными биологическими образцами.

Диссертационный обзор литературы, посвященный  $\alpha_5\beta_1$ -петельным рецепторам, можно назвать универсальным, т.к. в нем собраны и подробно проанализированы данные об их пространственном строении, о функционировании рецепторов как ионных каналов, о функциональной связи рецепторов с рядом патологий, а также рассмотрен весь спектр имеющихся низкомолекулярных и пептидно-белковых

лигандов данных рецепторов. Таким образом, литературный обзор удачно предваряет изложение основных результатов настоящей работы.

Результаты, выносимые на защиту, излагаются в виде 8 основных глав: первая глава посвящена разработке нового методического подхода, вторая и третья – анализу особенностей ингибирования Cys-петельных рецепторов трехпетельными белками, в следующих трех главах изложена новая информация о функциональной активности никотиновых и родственных рецепторов при ноцицепции, воспалении и нейропластичности мозга, следующая глава рассказывает о свойствах новых низкомолекулярных лигандов Cys-петельных рецепторов и завершает изложение глава о доклинических исследованиях нового недеполяризующего пептидного миорелаксанта. Таким образом, прослеживается логика построения диссертационного исследования, в котором автор перешла от фундаментальных исследований функциональной активности Cys-петельных рецепторов в организме и присущих им лиганд-рецепторных взаимодействий к важности этой молекулярной мишени при патологических состояниях и созданию нового пептидного лекарственного средства. Отдельно хочется отметить, что в диссертацию вошел материал, полученный в соавторстве со многими известными российскими и зарубежными научными коллективами, что дополнительно подчеркивает научную значимость полученных результатов. При этом основной вклад диссертанта не вызывает сомнений.

Особенности функционирования никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nAChR) в организме изучаются не первое десятилетие, однако автору удалось выявить целый ряд новых аспектов их физиологической и патофизиологической роли не только в нервной системе при нейропластичности и ноцицепции, но и за ее пределами при развитии острого воспалительного процесса. Одним из весьма популярных в последние годы направлений исследований является изучение роли nAChR в процессах обучения, развития и поддержания памяти, компенсаторных механизмах при нейродегенеративных заболеваниях и др. Получено довольно много экспериментального материала, подтверждающего существенную роль nAChR в самых различных процессах нейропластичности мозга. В рамках диссертационного исследования впервые удалось обнаружить, что определенные функционально-активные подтипы nAChR ответственны за развитие новообразованных нервных клеток во взрослом мозге грызунов и за ранние компенсаторные механизмы нейропластичности мозга мышей при нейродегенерации в результате моделирования болезни Паркинсона.

В последние годы прослеживается повышенный интерес к рецепторам нейромедиаторов периферической нервной системы и их взаимодействиям с окружающими клетками и тканями. Особое внимание уделяется вопросам болевой рецепции или ноцицепции. Большой раздел диссертационной работы посвящен этой проблеме, в частности, практически неизученному вопросу роли холинергической системы в патогенезе мигрени. Автору удалось существенно расширить научные знания в этом вопросе. На основании экспериментального материала представлена схема роли холинергической нервной передачи при ноцицепции в оболочках головного мозга, основном месте возникновения болей при мигрени. Сделан вывод об усиливающем влиянии активации никотиновых и мускариновых АХР на частоту болевой сигнализации в оболочках мозга, определены молекулярные мишени действия ацетилхолина, показано взаимодействие парасимпатической и ноцицептивной систем. Автор отдельно подчеркивает важную роль иммунных тучных клеток как одних из основных клеточных мишеней при холинергической иннервации оболочек мозга.

Известна немаловажная роль нАХР иммунных клеток при различных воспалительных процессах; все чаще исследователи говорят о важности нейроиммунной сигнализации в патогенезе заболеваний с воспалительным компонентом. В диссертационной работе подробно изучено влияние функционирования нАХР на защитные функции нейтрофилов. Показано, что воздействуя на определенные подтипы нАХР посредством специфических агонистов или антагонистов, можно усиливать или подавлять выработку активных форм кислорода и клеточную адгезию нейтрофилов. Таким образом, подтверждена терапевтическая значимость определенных подтипов нАХР нейтрофилов.

В диссертационной работе при исследовании функциональной роли никотиновых и родственных рецепторов нейромедиаторов в организме использован очень широкий набор специфических низкомолекулярных и пептидно-белковых лигандов. Автор однако весьма критически относится к выбору лигандов: не полагается на эффект одного соединения, но ставит несколько контрольных экспериментов с применением либо аналогичных по действию реагентов, либо отменяющих действие первого. Такая осторожность в выборе инструментов исследования становится очевидной из глав диссертационной работы, посвященных анализу действия известных и новых пептидно-белковых и низкомолекулярных лигандов. Из-за схожести строения Суспетельных рецепторов многие агенты проявляют заметную кросс-реактивность, что подчеркивается в литературном обзоре и далее продемонстрировано в

экспериментальной части работы. Одним из ярких примеров является открытие автором новой природной мишени действия  $\alpha$ -нейротоксинов змей, считавшихся исключительно высокоспецифичными ингибиторами nAHP. Для новой мишени (рецепторов гамма-аминомасляной кислоты) был также показан нетипичный механизм связывания  $\alpha$ -нейротоксинов. Большинство изучаемых в диссертационной работе лигандов не отличаются строгой селективностью действия, хотя проявляют предпочтительную аффинность к определенному рецептору. Например, целевыми рецепторами ингибиторного действия трехпетельного эндогенного белка SLURP1 человека оказались гетеромерные  $\alpha 3\beta 4$  nAHP, хотя он слабее действует и на другие гетеро- и гомопентамерные подтипы nAHP. В этой связи особенно ценна проведенная проверка селективности лигандов разных классов и обнаружение новых высокоспецифических агонистов и антагонистов nAHP. Так, были обнаружены новые «молчащие» агонисты  $\alpha 7$  nAHP, которые не проявляли кросс-реактивности в отношении других рецепторов. Соединения этого класса имеют обезболивающие и противовоспалительные свойства. Новые изученные ингибиторы nAHP, выделенные из яда кураре, обладали гораздо более высокой селективностью в отношении целевых рецепторов по сравнению с их структурными аналогами – *d*-тубокуарином и некоторыми клинически применяемыми недеполяризующими миорелаксантами. Еще более высокая селективность отличала новый миорелаксант на основе пептида аземиопсина, для которого в рамках диссертационной работы были проведены доклинические исследования безопасности и эффективности действия.

В целом, работа представляет собой серьезное фундаментальное научное исследование, вносящее заметный вклад в соответствующую область биоорганической химии и смежных дисциплин, которое также включает ряд прикладных результатов и выводов. Обоснованность выводов диссертационной работы обеспечивается проверкой каждого из ее положений несколькими независимыми методами и грамотной постановкой контрольных экспериментов. Но как любой научный труд, настоящая диссертационная работа не лишена некоторых недостатков:

1) Замечание касается раздела работы по изучению регуляторной роли никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nAHP) в функционировании нейтрофилов. Для индукции защитной реакции нейтрофилов (выработки активных форм кислорода) использовался бактериальный хемотаксический трипептид fMLF (N-Formyl-Met-Leu-Phe). В диссертационной работе был проведен ряд экспериментов по изучению влияния на этот процесс различных агонистов и антагонистов nAHP. Однако

в работе не указан механизм действия трипептида fMLF и не обсуждается его возможное прямое связывание с нАХР.

2) В ходе проведенных исследований автору удалось открыть и охарактеризовать ряд новых специфических «молчащих» агонистов  $\alpha 7$  нАХР среди природных и синтетических соединений. Проведенная работа дала новую структурную информацию о строении  $\alpha 7$  нАХР-селективного фармакофора, также автор подчеркивает фармакологическую перспективность этих соединений в качестве противовоспалительных, обезболивающих и противоопухолевых агентов. Мне представляется, что включение в работу тестирования их биологической активности не только на молекулярном, но и на клеточно-тканевом и организменном уровнях повысило бы фармакологическую ценность работы.

3) Сопряженный с предыдущим вопрос. Чем можно объяснить такой резко отличающийся профиль активности производного хинолина №7, которое оказалось антагонистом  $\alpha 7$  нАХР, в отличие от соединений №11, 13 и 14, весьма близких к нему по химической структуре, но являющихся «молчащими» агонистами этого подтипа нАХР?

4) Субхроническая токсичность лекарственного средства на основе синтетического пептида аземиопсина определялась в течение довольно непродолжительного периода времени, а именно при его 14-дневном введении с последующим 14-дневным периодом отмены препарата. Необходимо более подробно пояснить выбор данного временного интервала.

5) Изучение фармакокинетики лекарственного средства на основе синтетического пептида аземиопсина (Az) в йодированной форме проводилось при его внутривенном и внутримышечном введении мышам в дозах 0,25 и 0,5 мг/кг. Однако параметр LD50 (Az) при в/в и в/м введении мышам оценивался как 0,51 и 0,73 мг/кг, соответственно. Требуется пояснить, как удалось избежать смертности животных при изучении фармакокинетических параметров этого лекарственного средства.

Автореферат полно отражает основное содержание диссертации. Работа достаточно широко представлена научному сообществу: по теме диссертации опубликовано 23 статьи в зарубежных и российских научных журналах, получено 3 патента и написана монография. Также результаты диссертации были представлены на многочисленных международных и российских симпозиумах.

Диссертация Шелухиной Ирины Валерьевны является законченным научным исследованием, соответствующим всем критериям, в том числе п.9, "Положения о

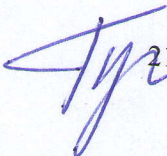
присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени доктора химических наук по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия».

Заведующая Отделом химии лекарственных средств  
Федерального государственного бюджетного  
научного учреждения «Научно-исследовательский  
институт фармакологии имени В.В. Закусова»,

д.б.н., чл.-корр. РАН

Гудашева Татьяна Александровна

125315, Россия, г. Москва,  
ул. Балтийская, д. 8  
Тел. (495) 6012302  
E-mail: gudasheva@academpharm.ru

 21 февраля 2020

Подпись д.б.н., чл.-корр. РАН Гудашевой Т. А.

«Удостоверяю»

Ученый секретарь ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»

к.б.н. Крайнева В. А.



