

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы на соискание степени доктора философии (PhD)
по образовательной программе «8D05109 – Нейронаука»

Жантлеуовой Айши Канатовны

**«Исследование воздействия непарализующих молекул ботулина на
нервную функцию»**

Общая характеристика работы. Диссертационное исследование направлено на изучение антиноцицептического потенциала нового непарализующего ботулинического нейротоксина (BoNT), удлиненного изопептидно-связанного BoNT (el-iBoNT), в животных моделях хронической боли.

Актуальность темы. Хроническую боль (ХБ) можно описать как боль, сохраняющуюся на протяжении длительного периода времени (более 3-6 месяцев) после стихания исходной причины (травмы или события). ХБ наносит значительный глобальный ущерб, затрагивая, по данным некоторых исследований, более 20% населения планеты. В отличие от острой боли, которая служит целям выживания, ХБ правильнее рассматривать как заболевание. В мировом масштабе она приводит к таким негативным последствиям, как увеличение затрат на здравоохранение, понижение работоспособности населения, социальная дезадаптация. В первую очередь это связано с отсутствием специальных безопасных подходов, выработанных для использования при хронических болевых состояниях. Так, в настоящий момент фармакологическое лечение ХБ основано на комбинации противосудорожных и противовоспалительных средств, антидепрессантов и опиоидов для купирования болевого синдрома. Недавно крупные организации, такие как Национальный институт здравоохранения и Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США, пришли к выводу, что такой подход лишь увеличивает расходы на здравоохранение, может привести к опиоидной зависимости, увеличению показателей инвалидности и смертности. Высокая распространенность и рефрактерный характер ХБ в сочетании с негативными последствиями зависимости от обезболивающих препаратов привели к повышенному интересу к разработке новых подходов контроля боли.

Использование ботулинического нейротоксина представляет собой одно из таких направлений. Ботулинический нейротоксин благодаря своему уникальному свойству долгосрочно блокировать нервную передачу BoNT стал эффективным средством для лечения/контроля множества заболеваний, среди которых можно отметить болевые синдромы. Использование BoNT в его

нативной форме имеет большой недостаток – такой нейротоксин, блокируя нейротрансмиссию ацетилхолина в нервно-мышечных синапсах, проявляет паралитическую активность. Это ограничивает максимально допустимую дозировку BoNT, введение которой безопасно для индукции анальгезии. В связи с этим разнообразные методы реинжиниринга белков, нацеленные на манипуляции структурой нейротоксина, были направлены на устранение паралитической активности BoNT. Они используются для повышения эффективности BoNT в качестве анальгетика, а также для повышения его профиля безопасности. Так, с помощью технологии SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein)-stapling были сконструированы: Binary Toxin (BiTox), Binary Toxin/AA (BiTox/AA), Tetanus Toxin (TetBot), Substance P Toxin (SP-Bot), Dermorphine Toxin (Derm-Bot), с помощью технологии SpyCatcher–SpyTag – isopeptide-bonded BoNT (iBoNT) и elongated isopeptide-bonded BoNT (el-iBoNT). В представленной диссертационной работе был использован удлинённый изопептидно-связанный ботулинический нейротоксин el-iBoNT, который отличается от остальных модификаций прежде всего более стабильной связью между компонентами, что исключает диссоциацию частей нейротоксина, а также его удлинённой структурой, что уменьшает возможные побочные эффекты, связанные с паралитическим действием.

Данное исследование было проведено в рамках программы целевого финансирования BR27198099«Развитие интегративных научных исследований по нейронауке», реализуемого Казахским национальным университетом им. аль-Фараби.

Цель исследования. Оценить потенциал новых ботулинических молекул el-iBoNT в качестве непарализующих анальгетиков на животных моделях хронической боли.

Задачи исследования:

1. Продуцировать ранее разработанный новый ботулинический препарат el-iBoNT с использованием технологии SpyCatcher–SpyTag;
2. Сравнить паралитическую активность нативного и нового нейротоксина с помощью визуальной оценки;
3. Оценить способность el-iBoNT корректировать поведенческую гиперчувствительность в модели хронической мигрени;
4. Оценить способность el-iBoNT корректировать поведенческую гиперчувствительность в модели болевой диабетической хронической нейропатии.

Объекты исследования: половозрелые самцы белых лабораторных крыс, рожденные и выращенные в условиях учебно-научной лабораторной

базы Казахского национального университета имени аль-Фараби (КазНУ им. аль-Фараби; г. Алматы, РК).

Предмет исследования. Эффективность нового непарализующего ботулинического препарата el-iBoNT в контроле болевых симптомов в животных моделях.

Методы исследования. В ходе работы были использованы молекулярно-генетические, биотехнологические, поведенческие, биохимические и статистические методы исследования. Молекулярно-генетические методы включали экспрессию рекомбинантных белков, их очистку, сборку el-iBoNT, гель-электрофорез. Биотехнологические методы – культивирование трансформированных клеток *E. coli* в различных питательных средах. Поведенческое тестирование включало в себя шкалу гримасы крысы, тест Харгривза на определение температурной чувствительности и электронный тест вон Фрея проводился на определение механической чувствительности. Концентрация глюкозы в крови крыс (биохимический показатель) оценивалась с помощью глюкометра. Статистический анализ был выполнен с использованием программы Prism 10.1.1, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA и IBM SPSS Statistics for Windows, Version 29.0.1.0 Armonk, NY, USA.

Исследовательская база. Все этапы исследования проводилось на базе лаборатории кафедры биофизики, биомедицины и нейронауки КазНУ им. аль-Фараби, за исключением этапа синтеза нового ботулинического препарата el-iBoNT. Данный этап был выполнен в лаборатории факультета биомедицинских наук университета Шеффилда (г. Шеффилд, Великобритания) во время научно-исследовательской стажировки.

Научная новизна диссертационной работы. Новый нейротоксин впервые был применен на модели нитроглицерин (NTG)-индуцированной хронической мигрени и стрептозотоцин (STZ)-индуцированной болевой диабетической периферической нейропатии. Впервые была изучена паралитическая активность el-iBoNT при введении в больших дозах. В первый раз была оценена способность el-iBoNT корректировать механическую и температурную гиперчувствительность с помощью электронного теста вон Фрея и теста Харгривза соответственно. Впервые продемонстрирована эффективность el-iBoNT в профилактике хронической мигрени с помощью шкалы гримасы крыс.

Теоретическая и практическая значимость работы. В настоящее время потенциал новых молекул ботулина в качестве непарализующих анальгетических агентов еще не изучен в животных моделях в полном объеме. Представленная работа направлена на исследование терапевтического

потенциала el-iBoNT, представляющего собой удлинённый ботулинический нейротоксин типа А (BoNT/A) с изопептидной связью, на модели NTG-индуцированной хронической мигрени и STZ-индуцированной болевой диабетической периферической нейропатии. В работе также изучается паралитическая активность нового препарата, так как именно сильный паралитический эффект нативного нейротоксина является основной причиной его ограниченного использования в настоящий момент. Установлено, что сконструированный ботулинический препарат el-iBoNT обладает выраженной антиноцицептической активностью в отношении хронической боли и сниженной паралитической активностью. Таким образом, был внесён вклад в понимание молекулярно-клеточных механизмов действия модифицированного ботулинического нейротоксина. Проведённое исследование даст направление для дальнейшего изучения созданной молекулы в лечении других болевых синдромов, при которых нежелательно паралитическое действие токсина. В перспективе исследование позволит создать новую лекарственную молекулу для лечения хронических болевых синдромов у людей.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Получен элонгированный ботулинический нейротоксин типа А с изопептидной связью методом рекомбинатного синтеза с хроматографической очисткой.
2. Показана пониженная паралитическая эффективность el-iBoNT при внутримышечном введении в больших дозах.
3. Продемонстрирована эффективность терапии боли el-iBoNT в модели хронической мигрени.
4. Показана эффективность терапии боли посредством el-iBoNT в модели болевой диабетической периферической нейропатии.

Личный вклад автора. Автором был исследован процесс безопасного производства молекул ботулина для контроля ХБ с помощью современных биохимических подходов, методов молекулярной и клеточной биологии; было проведено исследование эффективности нового ботулинического нейротоксина el-iBoNT на моделях NTG-индуцированной хронической мигрени и STZ-индуцированной болевой диабетической периферической нейропатии с помощью таких поведенческих тестов, как ШКТ, электронный тест вон Фрея и тест Харгривза; была изучена паралитическая активность нового препарата; были написаны тезисы, научные статьи, диссертационная работа согласно установленному плану, согласованному с научными консультантами. Так, самостоятельно был поставлен эксперимент, собраны

первичные данные, проведены статистический анализ и интерпретация результатов.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы доложены и опубликованы на следующих конференциях:

- Международная научная конференция студентов и молодых ученых «ФАРАБИ ӘЛЕМІ» (г. Алматы, РК, 4–7 апреля 2022);
- I Международная научно-практическая конференция «Интеграция наук: биофизика, биомедицина, нейронаука и биология» (г. Алматы, РК, 6 июня 2022);
- Международная научная конференция студентов и молодых ученых «ФАРАБИ ӘЛЕМІ» (г. Алматы, РК, 6–8 апреля 2023);
- II Международная научно-практическая конференция «Интеграция наук: биофизика, биомедицина, нейронаука и биология» (г. Алматы, РК, 25 мая 2023);
- Toxins 2024 7th International Conference (Berlin, Germany, 17-20 January 2024).

Основные результаты диссертации ежегодно заслушивались на заседаниях кафедры биофизики, биомедицины и нейронауки КазНУ им. аль-Фараби и на научных семинарах докторантов.

Публикации. Основное содержание диссертации отражено в 10 печатных работах в том числе 2 статьях в изданиях, входящим в первый (Q1) квартиль базы данных Scopus; 3 статьях в изданиях, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере образования и науки Министерства науки и высшего образования РК; 5 тезисах в материалах международных конференций, из которых 1 зарубежная.

Объём и структура диссертации. Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты исследований и их обсуждение, заключение, список использованной литературы и приложения. Диссертация изложена на 103 страницах компьютерного текста, содержит 21 таблицу, 24 рисунка и 2 приложения. Список использованных источников состоит из 183 наименований, из которых 91 опубликовано в последние 10 лет.