



СКОК

Марина Володимирівна – академік НАН України, завідувач лабораторії імунології клітинних рецепторів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

ХОЛІНЕРГІЧНІ МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ НЕЙРОЗАПАЛЕННЯ І НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦІЇ

Стенограма доповіді на засіданні
Президії НАН України 7 вересня 2022 року

Доповідь присвячено результатам робіт, проведених в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, з дослідження та з'ясування імуних механізмів розвитку нейрозапалення та нейродегенерації в людському організмі і розроблення терапевтичних підходів до лікування когнітивних порушень, спричинених нейрозапальними процесами, зокрема внаслідок інфікування вірусом SARS-CoV-2.

Вельмишановний Анатолію Глібовичу!

Шановні присутні!

Нейрозапалення супроводжує і може бути причиною розвитку багатьох нейропатологій. Запалення та оксидативний стрес пошкоджують нейрони мозку, що призводить до нейродегенеративних захворювань, найбільш відомим з яких є хвороба Альцгеймера.

Нейродегенерація в разі хвороби Альцгеймера супроводжується зменшенням об'єму мозку, накопиченням у ньому бляшок β -амілоїду та холінергічним дефіцитом, тобто порушенням сигналювання нейротрансмітером ацетилхоліном.

У цьому процесі важлива роль належить нікотинним ацетилхоліновим рецепторам (nAChR), особливо тим, що складаються з $\alpha 7$ субодиниць. Вони є важливими для пам'яті і когнітивних процесів, беруть участь у метаболізмі β -амілоїду, регулюють вивільнення прозапальних цитокінів і контролюють мітохондрійний шлях апоптозу, тобто сприяють нормальній життєздатності клітин мозку.

Мета досліджень, які тривають в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України упродовж останніх десяти років, полягає в тому, щоб оцінити в моделі на мишах внесок запалення і дефіциту $\alpha 7$ nAChR у розвиток симптомів, подібних до хвороби Альцгеймера, а також розробити підходи до їх протективної терапії.

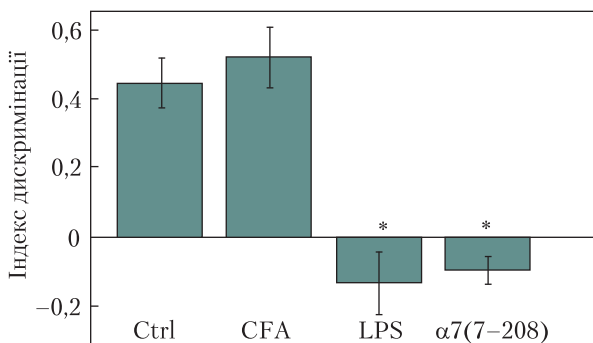


Рис. 1. Зниження епізодичної пам'яті мишей у тесті розпізнавання нового об'єкта після ін'єкцій ЛПС або імунізації $\alpha 7(1-208)$

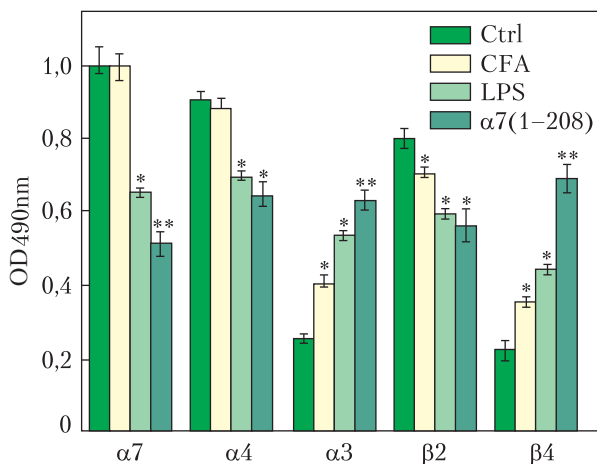


Рис. 2. Зміння спектру субодиниць nAChP у мозку піддослідних тварин

Для цього ми створили експериментальну модель, у якій мишам робили або внутрішньочеревне введення бактерійного ендотоксину — ліпополісахариду (ЛПС), або імунізували їх позаклітинною частиною $\alpha 7$ nAChP — фрагментом 1-208 з метою утворення антитіл проти цієї частини рецептора. Через 5 місяців таких регулярних процедур ми аналізували поведінку тварин, зокрема епізодичну пам'ять, субтипи nAChP, накопичення амілоїдогенних пептидів (1-40) і (1-42) в мозку, маркери запалення і мітохондрії мозку.

Для оцінки пам'яті мишей використовували поведінковий тест розпізнавання нового

об'єкта (novel object recognition test), в якому миші спочатку пропонують дослідити два однакових об'єкти, а потім, після невеликої перерви у 10—15 хвилин, один з об'єктів замінюють новим, незнайомим. Якщо миша пам'ятає старий об'єкт, вона витратить більше часу на дослідження нового. Про це свідчить так званий індекс дискримінації, який у нормальних здорових мишей дорівнює 0,4 і більше. Як можна бачити на рис. 1, після введення ЛПС або імунізації позаклітинною частиною $\alpha 7$ nAChP індекс дискримінації знизився фактично до нуля, тобто миші забули, яким був старий об'єкт, а це є ознакою погіршення епізодичної пам'яті, характерного для ранніх симптомів хвороби Альцгеймера.

При цьому в мозку мишей спостерігалось зниження $\alpha 7$, $\alpha 4$ і $\beta 2$ субодиниць nAChP, які беруть участь у процесі навчання і є відповідальними за формування пам'яті (рис. 2).

Через 5 місяців у мозку тварин відбувалося накопичення амілоїдогенних пептидів і посилення їх зв'язку з $\alpha 7$ субодиницями нікотинового рецептора. При цьому слід зауважити, що олігомеризація і полімеризація амілоїдних пептидів призводить до утворення так званих амілоїдних бляшок, які, як відомо, супроводжують перебіг хвороби Альцгеймера. У піддослідних мишей було виявлено також активацію клітин макроглії — астроцитів, які продукують прозапальні цитокіни, і зниження загальної кількості клітин у гіпокампі і стріатумі — зонах, відповідальних за формування пам'яті, тобто фактично ми спостерігали нейродегенерацію.

У мітохондріях мозку тварин спостерігалось також зниження кількості $\alpha 7$ субодиниць нікотинового рецептора, накопичення амілоїдогенних пептидів і підвищений викид цитохрому C у відповідь на Ca^{2+} , що є ознакою раннього етапу апоптозу, тобто початку загибелі клітин.

Отримані дані дозволили нам запропонувати загальну схему участі $\alpha 7$ nAChP у процесах нейродегенерації, в якій зниження $\alpha 7$ за дії запалення або антитіл проти позаклітинного домену $\alpha 7$ призводило до накопичення амілоїдогенних пептидів, пошкодження мітохондрій,

порушення епізодичної пам'яті і, врешті-решт, до загибелі нервових клітин мозку, тобто до нейродегенерації (рис. 3).

Ці дослідження стали основою для розроблення терапевтичних підходів до лікування нейрозапалення. Виявивши важливу роль $\alpha 7$ нікотинних рецепторів, далі ми спробували активувати їх для того, щоб запобігти патологічним змінам. Дійсно, було показано, що введення селективного агоніста $\alpha 7$ нАХР – синтетичної речовини PNU592987 – запобігало зниженню рівня $\alpha 7$ нАХР у разі дії ЛПС і підтримувало епізодичну пам'ять мишей (рис. 4).

Отже, отримані дані дозволили нам зробити кілька важливих висновків:

1) нейрозапалення супроводжується зменшенням кількості $\alpha 7$ нікотинних рецепторів у мозку і мітохондріях мозку та зростанням кількості $\beta(1-42)$, зв'язаного з $\alpha 7$ нАХР;

2) зниження кількості $\alpha 7$ нАХР в мозку за дії $\alpha 7$ -специфічних антитіл призводить до нейрозапалення і нейродегенерації;

3) активація $\alpha 7$ нАХР специфічним агоністом захищає мозок від патогенної дії ЛПС.

Ми також знайшли й інші терапевтичні підходи до запобігання таким патологічним змінам. Це, зокрема, антизапальна і нейропротекторна терапія за допомогою речовини ліпідного походження – N-стероїлетаноламіну, розробленої у відділі біохімії ліпідів нашого Інституту, а також використання мезенхімальних стовбурових клітин (цю частину досліджень ми проводили у співпраці з Інститутом генетичної і регенеративної медицини НАМН України). Отримані дані ми інтерпретували щодо нейродегенеративних захворювань, насамперед хвороби Альцгеймера. Деякі дослідження з цього напрямку було проведено у співробітництві з Інститутом геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України.

А потім прийшов Covid-19 – захворювання, яке, як відомо, в окремих випадках супроводжується надмірним запаленням з цитокіновим штормом, а також іноді призводить до порушень когнітивних функцій у людей, які перехворіли на нього, зокрема до проблем з пам'яттю. Цілком природно, що ми звернули

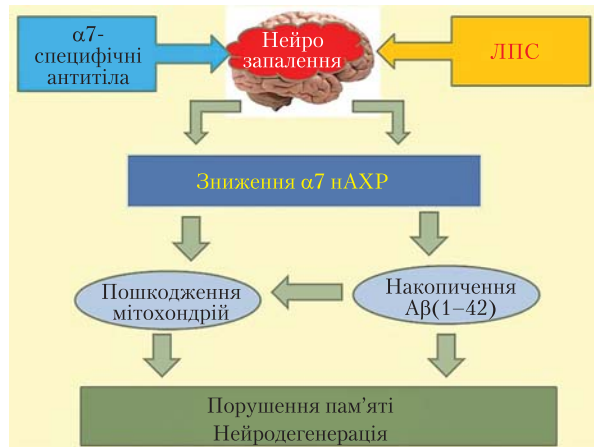


Рис. 3. Загальна схема зв'язку між нейрозапаленням мозку, спричиненим дією бактерійного ендотоксину ЛПС або $\alpha 7$ -специфічних антитіл, і нейродегенерацією

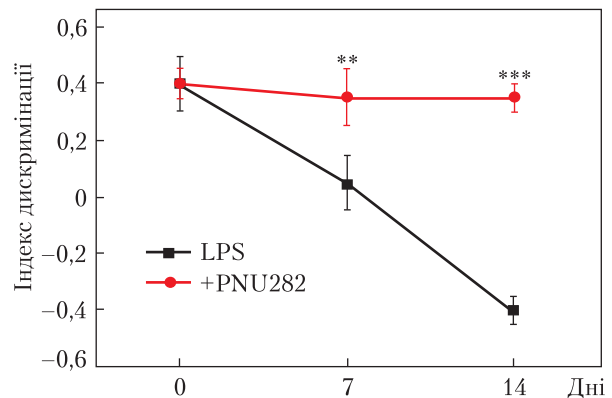


Рис. 4. Зміни епізодичної пам'яті у мишей під дією ЛПС та в разі введення агоніста $\alpha 7$ нАХР – PNU282987

увагу на можливість участі $\alpha 7$ ацетилхолінових нікотинних рецепторів у розвитку запальних процесів при захворюванні на Covid-19, яке викликає вірус SARS-CoV-2.

Першими цей зв'язок помітили французькі дослідники з Інституту Пастера. Наукова група під керівництвом професора Ж.-П. Changeux, якого по праву вважають одним з батьків-засновників напрямку з досліджень нікотинних рецепторів, виявила, що один із фрагментів спайк-білка SARS-CoV-2 (кластер позитивно заряджених залишків) має певну гомологічність з фрагментами відомих лігандів $\alpha 7$ нАХР – ко-

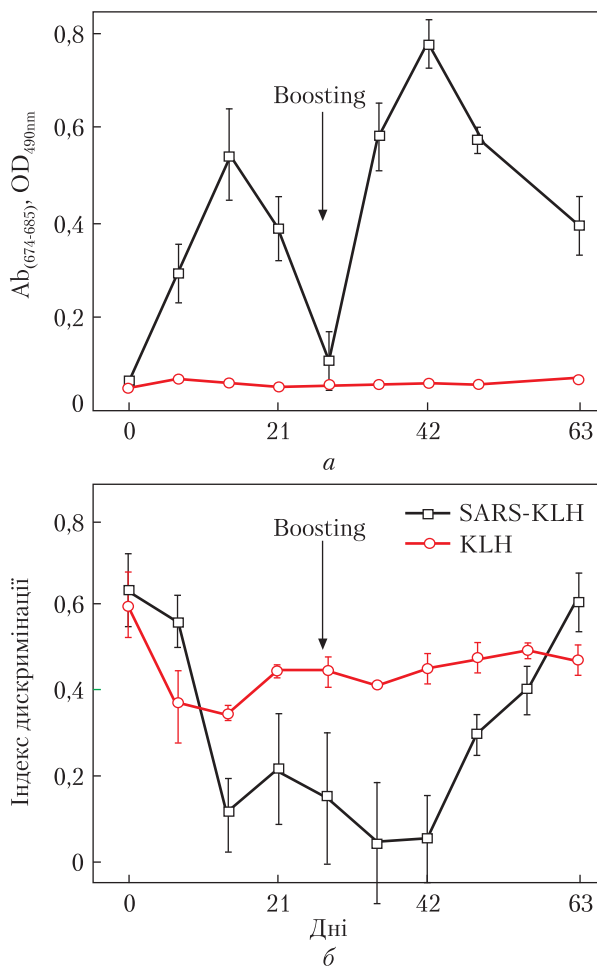


Рис. 5. Зв'язок між накопиченням у крові мишей анти-тіл проти пептиду 674-684 спайк-білка SARS-CoV-2 і погіршенням пам'яті у тварин: *а* – кількість антитіл у крові; *б* – індекс дискримінації, яким вимірювали епізодичну пам'ять мишей у тесті розпізнавання нового об'єкта

братоксином, α -бунгаротоксином і вірусом сказу, який проникає в клітину саме через нікотинові рецептори. Цей фрагмент спайкового білка коронавірусу вивільняється після розщеплення клітинними протеазами і, як вважають, є сайтом зв'язування вірусу з білком нейропіліном на поверхні клітини-мішені, що сприяє проникненню вірусу всередину клітини.

Ми показали, спочатку *in silico*, а потім і експериментально, що пептид 674-685 спайк-білка SARS-CoV-2 дійсно зв'язується з $\alpha 7$

нікотиновим рецептором і навіть впливає на мітохондрійні nAHP подібно до інших лігандів $\alpha 7$ nAHP. Однак прямих доказів того, що спайк-білок SARS-CoV-2 блокує $\alpha 7$ нікотинові рецептори і в такий спосіб сприяє запаленню, отримано не було.

Когнітивні порушення, зокрема порушення пам'яті, виникають у людей не відразу після інфікування SARS-CoV-2, а пізніше. Їх відносять до так званого постковідного синдрому, коли вірусу в організмі людини вже немає, але є сформована імунна відповідь на нього. Це навело нас на думку, що можна перевірити, як впливатиме на мишей імунізація фрагментом 674-684 спайк-білка SARS-CoV-2.

Після введення пептиду ми спостерігали у мишей дві хвили утворення антитіл проти нього, як і належить імунній відповіді. Перший пік антитіл було виявлено на 14-й день, і саме тоді у тварин було зафіксовано зниження індексу дискримінації в тесті розпізнавання нового об'єкта. Далі, зі зниженням кількості антитіл епізодична пам'ять почала потроху відновлюватися, але після повторної імунізації, коли знову став зростати рівень антитіл, індекс дискримінації знизився ще більше. Згодом кількість антитіл у мишей почала зменшуватися, а індекс дискримінації повернувся до початкових значень. (рис. 5).

Ми підтвердили, що антитіла проникали в мозок імунізованих мишей, і спостерігали в них таке саме зменшення кількості $\alpha 7$ нікотинових рецепторів, як і у випадку нейрозапалення. Відповідно, ми вирішили застосувати ті самі терапевтичні підходи, які використовували для лікування порушення пам'яті при нейрозапаленні, а саме, спробувати активувати $\alpha 7$ nAHP введенням селективного агоніста ацетилхолінових нікотинових рецепторів. Однак у цьому разі замість PNU592987 ми застосували природний агоніст $\alpha 7$ nAHP – холін.

Введення холіну мишам, імунізованим фрагментом 674-684 спайк-білка SARS-CoV-2, запобігало погіршенню пам'яті і зниженню $\alpha 7$ nAHP у мозку тварин (рис. 6).

Ці результати ми отримали вже більш як рік тому, однак, коли ми спробували їх опублі-

кувати, нам довго не хотіли вірити, аж поки один із рецензентів не порадив, що ми можемо довести нашу ідею, якщо підтвердимо, що введені ззовні антитіла проти пептиду SARS-CoV-2 спричиняють порушення пам'яті у мишей. Тоді ми імунізували мишей фрагментом 674-684 спайк-білка SARS-CoV-2, виділили їх імуноглобуліни із сироватки крові і ввели їх здоровим мишам. Через три дні здорові миші втратили епізодичну пам'ять. Цей ефект був адитивним до дії ЛПС і, подібно до ЛПС, після введення імуноглобулінів спостерігалось підвищення рівня прозапальних цитокінів у мозку мишей.

Нас здивувало те, що ефект антитіл, утворених після імунізації фрагментом SARS-CoV-2, виявився таким, який можна було б очікувати від антитіл проти $\alpha 7$ нікотинових рецепторів. У наступному експерименті ми показали, що введені ззовні антитіла проти $\alpha 7$ нікотинових рецепторів також погіршують пам'ять мишей, а якщо імуноглобуліни мишей, імунізованих пептидом 674-685 спайк-білка SARS-CoV-2, пропустити через афінний сорбент з $\alpha 7$, то їх вплив на пам'ять зменшується (рис. 7). Отже, виходило так, що в крові мишей, імунізованих фрагментом спайк-протеїну SARS-CoV-2, мають бути наявні антитіла проти $\alpha 7$.

І ми показали, що це дійсно так. Більше того, спроби видалити із сироватки крові антитіла проти $\alpha 7$ також приводили до зниження рівня антитіл проти пептиду 674-685 спайк-білка SARS-CoV-2, тобто ці два типи антитіл якимось пов'язані один з одним.

Ці несподівані дані поставили перед нами два питання:

1) в чому причина появи $\alpha 7$ -специфічних антитіл після імунізації фрагментом 674-685 спайкового білка SARS-CoV-2?

2) чи наявні такі антитіла в крові людей, які переохворіли на Covid-19 або були вакциновані проти Covid-19?

Щодо першого питання, було виявлено, що антитіла проти $\alpha 7$ з'являються в крові мишей пізніше, ніж антитіла проти пептиду спайк-протеїну SARS-CoV-2, тобто фактично вони є відповіддю організму на появу перших анти-

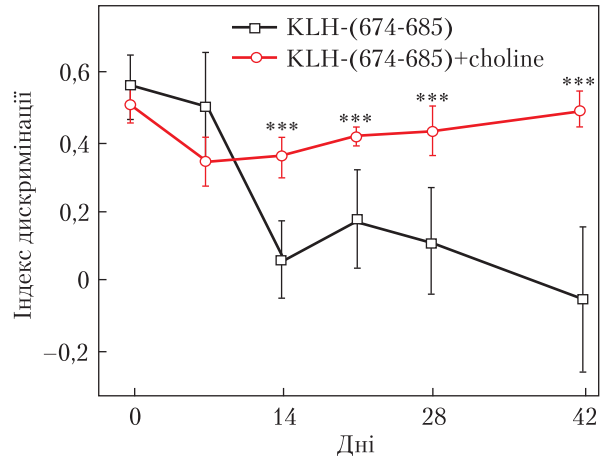


Рис. 6. Вплив холіну як агоніста $\alpha 7$ nAHP на епізодичну пам'ять у мишей, імунізованих фрагментом 674-684 спайк-білка SARS-CoV-2

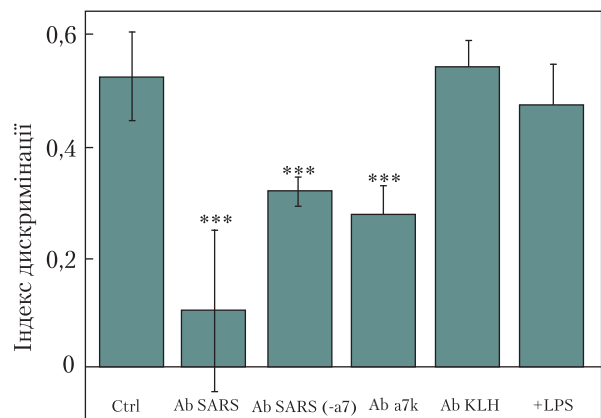


Рис. 7. Імуноглобуліни, виділені з крові мишей, імунізованих пептидом 674-685 спайк-білка SARS-CoV-2, погіршують пам'ять здорових тварин подібно до антитіл проти $\alpha 7$ (179-190), а афінне видалення антитіл проти $\alpha 7$ зменшує ефект антитіл проти SARS-CoV-2

тіл. Це явище відоме в імунології як антиідіотипічні антитіла і є характерним для відповіді на вірусні інфекції. Стосовно SARS-CoV-2, це питання потребує подальшого вивчення, що й буде предметом наших майбутніх досліджень.

Що стосується другого питання, то в крові людей, які переохворіли на Covid-19 2,5–6 місяців тому, зокрема у пацієнта М., який є співробітником нашого Інституту і в якого були виражені когнітивні постковідні симпто-

ми, були наявні антитіла як проти фрагменту 674-685 спайк-білка SARS-CoV-2, так і проти $\alpha 7$ нікотинових рецепторів. У іншого пацієнта після подвійної імунізації вакциною Корона-вак (це мої персональні дані) антитіла проти $\alpha 7$ знизилися після першої вакцинації, а після другої вакцинації їх рівень почав зростати.

Дослідження антитіл у крові людей потребують продовження і напрацювання надійної статистики, однак навіть наявні на сьогодні дані дозволяють дійти таких висновків:

1) антитіла, які утворюються у відповідь на інфікування вірусом SARS-CoV-2 або на

вакцинацію проти COVID-19, впізнають як пептидний фрагмент спайк-протеїну SARS-CoV-2, так і фрагмент $\alpha 7$ nAChR;

2) такі антитіла здатні проникати в мозок і викликати нейрозапалення і порушення пам'яті;

3) застосування холіну або інших агоністів $\alpha 7$ nAChR можна надалі розглянути як терапевтичний підхід до лікування постковідних і поствакцинальних когнітивних порушень.

Дякую за увагу!

*За матеріалами засідання
підготувала О.О. Мележук*

Maryna V. Skok

Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5816-605X>

CHOLINERGIC MECHANISMS OF NEUROINFLAMMATION AND NEURODEGENERATION DEVELOPMENT

Transcript of scientific report at the meeting of the Presidium of NAS of Ukraine,
September 7, 2022

The report is devoted to the results of work carried out at Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine on research and elucidation of the immune mechanisms of neuroinflammation and neurodegeneration development in the human body and the development of therapeutic approaches to the treatment of cognitive disorders caused by neuroinflammatory processes, in particular due to the infection with SARS-CoV-2 virus.