

УДК 577.25 577.115

# Новые ингибиторы никотиновых ацетилхолиновых рецепторов на основе аналогов олеоилхолина

М. В. Владыкина<sup>#</sup>, И. С. Кокаева<sup>#</sup>, И. Е. Кашеверов, Н. М. Грецкая, Г. Н. Зинченко, В. И. Цетлин, Ю. Н. Уткин, В. В. Безуглов, И. В. Шелухина\*

Государственный научный центр Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, отдел молекулярной нейроиммунной сигнализации, Москва, 117997 Россия

<sup>#</sup> Авторы, внесшие равный вклад в работу.

\*E-mail: shelukhina.iv@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.05.2025

Принята к печати 16.01.2026

DOI: 10.32607/actanaturae.27696

**РЕФЕРАТ** Ацилированные жирными кислотами холины – недавно открытый класс эндогенных соединений человека и животных. Ранее мы показали, что олеоилхолин (Ol-Chol) и другие ацилхолины в микромолярном диапазоне концентраций являются модуляторами холинергической системы и могут использоваться в качестве катионных липидов для доставки нуклеиновых кислот в клетки человека и животных. В настоящей работе исследовано взаимодействие с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами (nAChR) двух ионных форм Ol-Chol и двух синтетических катионных липидов, содержащих четвертичную аммониевую группу и два остатка олеиновой кислоты. Радиолигандным анализом показано, что сродство обоих ацилхолинов и синтетических катионных липидов к мышечному типу nAChR в 2–5.5 раза выше, чем к нейрональному  $\alpha 7$  nAChR человека. Иодид олеоилхолина в 2 раза более эффективно, чем мезилат, взаимодействовал с ортостерическим сайтом связывания мышечного и  $\alpha 7$  nAChR, а в функциональном тесте кальциевого имиджинга оба соединения оказались на порядок более эффективными ингибиторами  $\alpha 7$  nAChR, что может свидетельствовать об их дополнительном действии через аллостерические участки связывания рецептора. Синтетические катионные липиды заметно уступали олеоилхолину в сродстве к  $\alpha 7$  nAChR и, в отличие от него, оказывали выраженное цитотоксическое действие на клетки нейробластомы SH-SY5Y, которое не блокировали специфические лиганды nAChR. Таким образом, четвертичная аммониевая группа в составе всех исследованных соединений придает им свойства ингибиторов nAChR, а усложнение структуры липофильной части молекулы введением двух остатков олеиновой кислоты ухудшает эти свойства, но усиливает их цитотоксическое действие по независимому от nAChR механизму.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** ацилированные холины, никотиновый ацетилхолиновый рецептор, ингибитор, DOTAP, SH-SY5Y, цитотоксичность.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** nAChR – никотиновый ацетилхолиновый рецептор;  $\alpha$ Bgt –  $\alpha$ -бунгаротоксин из яда *Bungarus multicinctus*; [<sup>125</sup>I]- $\alpha$ Bgt –  $\alpha$ -бунгаротоксин, меченный изотопом иода-125; CTX –  $\alpha$ -кобротоксин из яда *Naja kaouthia*; LDH – лактатдегидрогеназа; Ol-Chol<sup>+</sup>I<sup>-</sup> – олеоилхолиниодид; Ol-Chol<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup> – олеоилхолинмезилат; DOTAP<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup> – (1,2-бис-(9Z-октадеценилокси)-3-триметиламмонийпропан)мезилат; DOGG-Chol<sup>+</sup>I<sup>-</sup> – иодид холинового эфира 4-(((1,3-бис(олеоилокси)пропан-2-ил)окси)карбонил)амино)бутановой кислоты; Nic – никотин; Mes – мекамиламин; dTC – d-тубокурарин; MLA – метилликаконитин; ГАМК – гамма-аминомасляная кислота.

## ВВЕДЕНИЕ

Аналоги ацетилхолина – холиновые эфиры ненасыщенных жирных кислот – были недавно обнаружены в плазме и моче человека [1]. Кроме того, содержание длинноцепочечных ненасыщенных ацилхолинов повышено при некоторых заболеваниях

и. Так, например, в тканях кровеносных сосудов пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями (аневризма брюшной аорты, атеросклеротические бляшки сонных артерий, атеросклеротические бляшки бедренных артерий и утолщение интимы) идентифицированы холиновые эфиры олеиновой,

линолевой и арахидоновой кислот [2, 3]. Содержание ацилхолинов, особенно ненасыщенных, повышено в образцах крови пациентов с высоким риском тромбоэмболии легочной артерии (ТЭЛА) по сравнению с образцами, полученными от пациентов со средним риском ТЭЛА [4]. Таким образом, накопление ацилхолинов может быть связано с развитием ряда патологий у человека, однако механизм действия ацилхолинов остается малоизученным.

Ранее мы показали, что некоторые эндогенные ацилхолины, такие как арахидоноилхолин, олеоилхолин (Ol-Chol), линоленоилхолин и докозагексаеноилхолин, в микромолярном диапазоне концентраций ингибируют мышечный и  $\alpha 7$  нейрональный никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAХР), а также ферменты гидролиза ацетилхолина [5]. Это подтверждает гипотезу о том, что механизм биологической активности эндогенных ацилхолинов связан с их модулирующим воздействием на сигнальные системы, в которых участвует ацетилхолин. Не исключено, что эндогенные ацилхолины могут выступать как ингибиторы онкологического процесса, когда раковые клетки чувствительны к ингибированию  $\alpha 7$  nAХР, например, при раке легкого [6].

Ацилхолины содержат четвертичную аммониевую группу и представляют собой катионные липиды, что может использоваться для доставки нуклеиновых кислот в клетки млекопитающих [7]. Одним из наиболее распространенных катионных липидов, используемых для трансфекции, является DOTAP (1,2-бис-(9Z-октадеценилокси)-3-триметиламмонийпропан), который, как и холиновые эфиры, содержит заряженную четвертичную аммониевую группу [8, 9]. Однако, несмотря на сходство структуры DOTAP и холиновых эфиров, способность этого катионного липида взаимодействовать с ацетилхолиновыми рецепторами ранее не была изучена. Также нами показано, что эффективность клеточной трансфекции зависит от противоиона используемого катионного липида [7], но остается неизвестным, как природа противоиона влияет на способность ацилхолина ингибировать nAХР.

В настоящей работе изучено взаимодействие с мышечным и нейрональным  $\alpha 7$  nAХР двух ионных форм Ol-Chol и двух синтетических катионных липидов, содержащих четвертичную аммониевую группу и два остатка олеиновой кислоты. С этой целью нами синтезированы две формы олеоилхолина (йодид и мезилат), а также DOTAP мезилат и новый аналог DOTAP, содержащий холиновую группу на некотором расстоянии от липофильного диолеоилглицеринового остатка – йодид холинового эфира 4-(((1,3-бис(олеоилокси)пропан-2-ил)окси)карбонил)

амино)бутановой кислоты (рис. 1). Оба эти соединения, в отличие от олеоилхолина, содержат два остатка ненасыщенной жирной (олеиновой) кислоты.

nAХР являются лиганд-управляемыми мембранными катионными каналами [10]. nAХР мышечного типа находятся на мышечных волокнах в местах нервно-мышечных синапсов и отвечают за передачу нервного импульса эффекторной клетке, тогда как  $\alpha 7$  nAХР весьма широко распространены в организме и присутствуют как на нервных, так и на других типах клеток, например, на иммунных клетках, клетках глии, эпителия и др. [11–13].  $\alpha 7$  nAХР модулируют целый ряд клеточных процессов, таких как высвобождение нейротрансмиттеров, цитокинов и нейротрофических факторов, а также последующую передачу сигналов, экспрессию генов и т.д. [11, 14]. Нарушение функционирования мышечного nAХР связано с развитием миастений, а  $\alpha 7$  nAХР – с нейродегенеративными и психическими заболеваниями, хронической болью, сепсисом, ревматоидным артритом, онкозаболеваниями и др. [6, 12, 15]. В связи с этим  $\alpha 7$  nAХР рассматривают как молекулярную мишень для разработки и направленной доставки лекарственных средств [16, 17].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Материалы

Диолеоилглицерид (любезно предоставлен Е.Л. Водовозовой ИБХ РАН), N,N'-дисукцинимидилкарбонат (DSC, Sigma-Aldrich, США), гамма-аминомасляная кислота (Acros Organics, Германия, > 99%), бис(триметилсилил)трифторацетамид (BSTFA, Acros Organics), Kieselgel 60 (Merck, США), триэтиламин, иодметан (Acros Organics, > 99%), 1,1'-карбонилдиимидазол (1,1'-CDI, Fluka, Швейцария), диметиламинопиридин (DMAPI) (Fluka, Швейцария), диметиламиноэтанол (DMAE) (Sigma-Aldrich), бисульфат Na (Fluka), безв. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, этилацетат, бензол, хлористый метилен, ацетонитрил, ацетон, HCl, NaCl («Химмед», Россия).

Использовали следующие реактивы: Fluo-4 Direct Calcium Assay Kit (ThermoFisher Scientific, США), резазурин (Macklin Inc., Шанхай, Китай), а также ряд лигандов nAХР: никотин Nic (Sigma-Aldrich), мекамиламин Mec, d-тубокурарин d-TC, метилликаонитин MLA, PNU120596, PNU282987 (Tocris, Великобритания), линию клеток нейробластомы человека SH-SY5Y (Sigma-Aldrich). Препарат мембран электрического органа ската *Torpedo californica* предоставлен Ф. Хухо (Свободный университет Берлина, Германия). Суспензия клеток GH4C1 предоставлена компанией EliLilly, Великобритания.

**Синтез иодида холинового эфира  
4-(((1,3-бис(олеилокси)пропан-2-ил)  
окси)карбонил)амино)бутановой кислоты  
(DOGG-Chol<sup>+</sup>I)**

К раствору диолеилглицерида (100 мг (0.16 ммоль)) в 1 мл хлороформа добавили 45 мг (0.18 ммоль) N,N'-DSC и 48 мкл (0.48 ммоль) триэтиламина. Перемешивали при 25°C в течение 20 мин до полного растворения компонентов смеси (раствор 1). К суспензии 50 мг (0.5 ммоль) гамма-аминомасляной кислоты в 500 мкл ацетонитрила прибавляли 0.5 мл (1.94 ммоль) бис(триметилсилил)трифторацетамида и перемешивали при 25°C до полного растворения гамма-аминомасляной кислоты. Полученный раствор прибавляли к полученному выше раствору 1. Реакционную смесь перемешивали в течение 18 ч при +4°C. Затем смесь экстрагировали этилацетатом, экстракт промывали 2 N раствором бисульфата Na, H<sub>2</sub>O, насыщенным раствором NaCl и высушивали над безв. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и упаривали. Собрали 118 мг вещества в виде слегка желтоватого масла. Искомый продукт выделяли с помощью колоночной хроматографии на силикагеле Kieselgel 60, используя градиент системы бензол–этилацетат от 0 до 15% этилацетата. Собрали 47 мг 4-(((1,3-бис(олеилокси)пропан-2-ил)окси)карбонил)амино)бутановой кислоты (DOGG) (39%) в виде бесцветного масла. <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>; м.д., J, 300 Гц) 0.90 (6H, т, 2H18), 1.28–1.32 (40H, м, 2H4; 2H5; 2H6; 2H7; 2H12; 2H13; 2H14; 2H15; 2H16; 2H17), 1.63 (4H, м, 2H3), 1.88 (2H, H3' (ГАМК)), 2.03 (8H, м, 2H8; 2H11), 2.34 (4H, 2H2), 2.43 (2H, H2' (ГАМК)), 3.27 (2H, м, H4'), 4.20–4.28 (4H, дм, 2H2' (глицерин)), 4.89 (1H, H1' (глицерин)), 5.36 (4H, м, 2H9; 2H10).

К 36 мг (0.05 ммоль) DOGG, растворенного в 500 мкл хлористого метилена, добавляли 10 мг (0.06 ммоль) 1,1'-CDI, 8 мкл (0.06 ммоль) триэтиламина и перемешивали при 22°C на магнитной мешалке в течение 60 мин. К полученному имидазолиду 4-(((1,3-бис(олеилокси)пропан-2-ил)окси)карбонил)амино)бутановой кислоты прибавляли 1.8 мг (0.015 ммоль) DMAE и 10 мкл (0.1 ммоль) DMAE и перемешивали в течение 18 ч при 22°C в атмосфере аргона. Затем разбавляли реакционную смесь хлороформом, промывали 0.1 N HCl и H<sub>2</sub>O, органический слой промывали насыщенным раствором NaCl и высушивали над безв. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Органический слой фильтровали и упаривали. Продукт очищали хроматографией на колонке (Kieselgel 60). Элюировали смесью гексан–ЭА, 9 : 1, гексан–ЭА, 30 : 10, хлороформ–метанол, 10 : 1. Собрали 19.7 мг (48.6%) в виде бесцветного масла. Полученный продукт для его кватернизации растворяли в сухом ацетоне и обрабатывали 6-кратным избытком

иодметана. Получили 22.4 мг (96%) DOGG-Chol<sup>+</sup>I в виде белых кристаллов. <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>; м.д., J, 300 Гц) 0.90 (6H, т, 2H18), 1.28–1.32 (40H, м, 2H4–7; 2H12–17), 1.63 (4H, м, 2H3), 1.88 (2H, H3' (ГАМК)), 2.03 (8H, м, 2H8; 2H11), 2.34 (4H, 2H2), 2.43 (2H, H2' (ГАМК)), 3.27 (2H, м, H4'), 3.34 (2H, H1' DMAE), 4.20–4.28 (6H, дм, 2H2' (глицерин)), H2' DMAE), 4.89 (1H, H1' (глицерин)), 5.36 (4H, м, 2H9; 2H10).

**Конкурентный радиолигандный анализ**

Мембраны электрического органа ската *Torpedo californica*, содержащие α1β1γδ nAХР мышечного типа (с конечной концентрацией токсинсвязывающих сайтов 0.52 нМ) или клетки линии GH4C1, экспрессирующие нейрональный α7 nAХР человека (конечная концентрация токсинсвязывающих сайтов равна 0.4 нМ) инкубировали с различными концентрациями ацилхолинов, добавленных в виде раствора в ДМСО, при комнатной температуре в буфере для связывания (20 мМ Трис-HCl, 1 мг/мл БСА, pH 8.0; объем 50 мкл) в течение 2 ч 50 мин или 3 ч 30 мин соответственно. Итоговый буфер для каждой точки конкретного эксперимента, включая точки контроля 100 и 0% связывания, был выровнен по максимальному количеству ДМСО (от 0.15 до 1.5% в разных сериях экспериментов), добавленному в реакционную смесь с исследуемыми ацилхолинами. Затем к образцам добавляли [<sup>125</sup>I]-αBgt в конечной концентрации 0.2 нМ и инкубировали в течение еще 5 мин. Несвязавшийся [<sup>125</sup>I]-αBgt удаляли быстрой фильтрацией реакционной смеси через GF/C фильтры (Whatman, Великобритания) и трехкратной промывкой буфером для связывания (по 3 мл буфера). Используемые фильтры предварительно обрабатывали 0.25% полиэтиленгликолем. За 100% связывание принимали связывание радиолиганда в отсутствие каких-либо вытеснителей; уровень неспецифического связывания (0%) определяли по аналогичному опыту, в котором препараты мышечного и α7 nAХР инкубировали в присутствии 9 мкМ α-кобратоксина (СТХ) в течение 2 ч 50 мин или 3 ч 30 мин соответственно. Количественные измерения связавшегося [<sup>125</sup>I]-αBgt проводили с использованием γ-счетчика Wallac Wizard 1470 (GMI Inc., США). Результаты взаимодействия исследуемых соединений с соответствующими мишенями анализировали в виде значений IC<sub>50</sub> при помощи программы OriginPro 2015 (Microcal, США).

**Кальциевый имиджинг**

Клетки линии SH-SY5Y нейробластомы человека культивировали в ростовой среде, состоящей из среды DMEM («ПанЭко», Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS, neoFroxx GmbH,

Германия), антибиотиков пенициллина (50 ЕД/мл) и стрептомицина (50 мкг/мл, «ПанЭко») при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (5% CO<sub>2</sub>). Для кальциевого имиджинга клетки рассеивали в черный 96-луночный планшет (SPL Life Sciences, Корея) по 5000–10000 клеток в лунку и растили до достижения 80–90% монослоя. Затем заменяли среду роста буфером, содержащим 140 мМ NaCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 2.8 мМ KCl, 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 20 мМ HEPES, 10 мМ глюкозы, pH 7.4, и инкубировали клетки в присутствии Fluo-4 Direct Calcium Assay Kit (ThermoFisher Scientific, США) в темноте в течение 30 мин при 37°C, а затем еще 30 мин при комнатной температуре. Перед добавлением специфического агониста α7 nAХР (200 нМ PNU 282987 (Tocris, Великобритания)) клетки SH-SY5Y инкубировали в течение 20 мин с растворами исследуемых веществ и специфического позитивного модулятора α7 nAХР (10 мкМ PNU 120596 (Tocris)). Полного ингибирования наблюдаемых кальциевых ответов достигали инкубацией клеток с 1 мкМ раствором α-кобратоксина СТХ, специфического антагониста α7 nAХР, в течение 20 мин.

Изменения флуоресценции индикатора Fluo-4 (lex/em = 485/535 ± 10 нм) детектировали с помощью микропланшетного флуориметра Hidex Sense Microplate Reader (Hidex, Финляндия). Изменения интенсивности флуоресценции анализировали с использованием программы OriginPro 2017 (OriginLab Corporation, США).

#### Резазуриновый тест для оценки метаболической активности клеток

Клетки SH-SY5Y рассеивали в прозрачный 96-луночный планшет (SPL Life Sciences, Корея) по 3000 клеток в лунку. Через 24 ч к клеткам добавляли исследуемые вещества Ol-Chol<sup>+</sup>I<sup>-</sup>, Ol-Chol<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup>, DOGG-Chol<sup>+</sup>I<sup>-</sup>, DOTAP<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup> в концентрации 6.25–100 мкМ, а также лиганды nAХР: 100 мкМ никотин (Nic, Sigma-Aldrich, Германия), мекамиламин (Mes), d-тубокурарин (d-TC), метилликаконитин (MLA); 10 мкМ PNU 120596, PNU 282987 (Tocris, Великобритания); 1 мкМ α-кобратоксин СТХ. Клетки культивировали в течение 72 ч, после чего определяли метаболическую клеточную активность с использованием резазурина как описано ранее [18]. Культуральную среду удаляли, клетки инкубировали в течение 4 ч с раствором резазурина (Macklin Inc., Китай) в буфере, содержащем 140 мМ NaCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 2.8 мМ KCl, 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 20 мМ HEPES, 10 мМ глюкозы, pH 7.4. После этого оценивали интенсивность флуоресценции (lex/em = 550/590 ± 10 нм) продукта восстановления резазурина (резорурфин) с помощью микро-

планшетного флуориметра (Hidex, Финляндия). Отрицательным контролем служили лунки без клеток, положительным – интактные клетки SH-SY5Y.

#### Определение активности внеклеточной лактатдегидрогеназы (LDH) для оценки цитотоксичности соединений

Клетки SH-SY5Y рассеивали в прозрачный 96-луночный планшет (SPL Life Sciences, Корея) по 3000 клеток в лунку. Через 24 ч к клеткам добавляли Ol-Chol<sup>+</sup>I<sup>-</sup> и DOTAP<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup> в концентрации 6.25–100 мкМ, культивировали в течение 72 ч и определяли активность внеклеточной лактатдегидрогеназы с использованием набора LDH Cytotoxicity Assay kit (Wuhan Servicebio Technology Co., Ltd., Китай) по методике производителя. Отобранную культуральную среду (80 мкл) инкубировали в течение 30 мин с 80 мкл рабочего раствора для детекции лактатдегидрогеназы, после чего определяли оптическую плотность раствора при λ = 490 нм с использованием микропланшетного ридера Hidex Sense Microplate Reader (Hidex, Финляндия). Отрицательным контролем служили лунки без клеток, положительным – лизированные клетки SH-SY5Y (Cell lysis buffer, LDH Cytotoxicity Assay kit).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

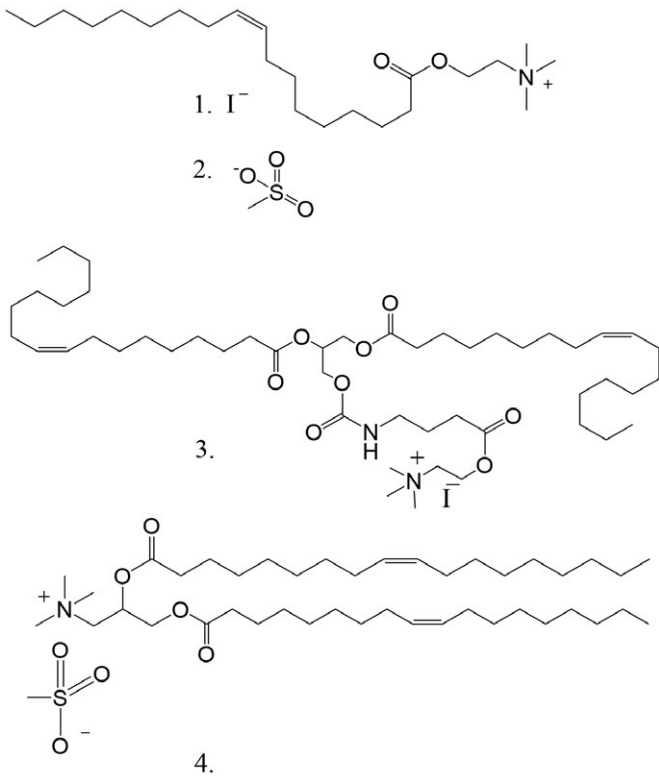
#### Синтез ацилхолинов и их катионных диолеоильных аналогов

Использованные в работе соединения (рис. 1) получены химическим путем. Олеилхолин в форме иодида (Ol-Chol<sup>+</sup>I<sup>-</sup>) и мезилата (Ol-Chol<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup>) синтезировали согласно [19]. DOTAP мезилат синтезировали из 3-(диметиламино)-1,2-пропандиола и олеиновой кислоты [20] с последующей кватернизацией диметилсульфатом. DOGG-Chol<sup>+</sup>I<sup>-</sup> был получен из 1,2-диолеоилглицерина путем последовательного введения в его структуру ГАМК и холина.

#### Взаимодействие синтезированных соединений с никотиновыми холинорецепторами

Способность синтезированных соединений взаимодействовать с ортостерическим участком связывания nAХР оценивали с помощью радиолигандного анализа, а функциональную активность nAХР определяли методом кальциевого имиджинга.

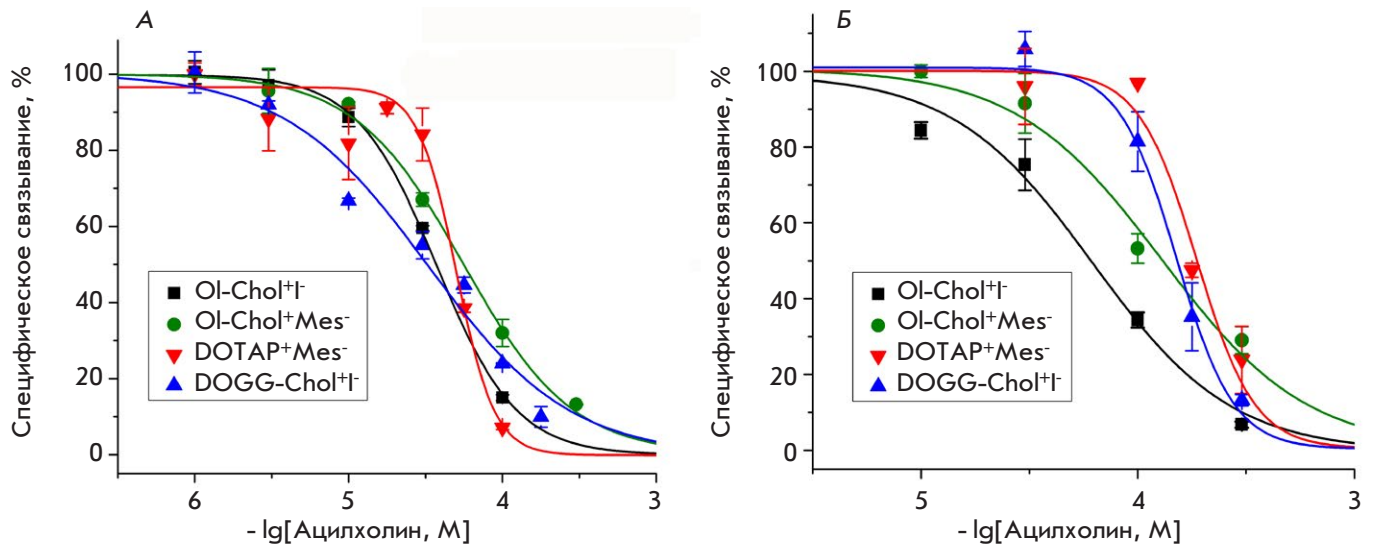
Для исследования взаимодействия иодида и мезилата олеилхолина и катионных липидов DOGG-Chol<sup>+</sup>I<sup>-</sup> и DOTAP<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup> с ортостерическим участком связывания nAХР анализировали их конкуренцию с α-бунгаротоксином, меченым радиоактивным изотопом иода ([<sup>125</sup>I]-αBgt), за связывание с мышечным nAХР электрического органа ската



**Рис. 1.** Структуры исследованных ацилхолинов: 1 – олеоилхолин иодид (OI-Chol<sup>+</sup>I<sup>-</sup>), 2 – олеоилхолин мезилат (OI-Chol<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup>), 3 – иодид холинового эфира 4-(((1,3-бис(олеоил)пропан-2-ил)окси)карбонил)амино)бутановой кислоты (DOGG-Chol<sup>+</sup>I<sup>-</sup>), 4 – мезилат 1,2-бис-(9Z-октадеценоил)-3-триметиламмоний 1,2-диоксипропана (DOTAP<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup>)

*T. californica* и нейронным  $\alpha 7$  нАХР человека с использованием радиолигандного метода (рис. 2). Оказалось, что все соединения связываются с ортостерическими сайтами обоих рецепторов (рис. 2). Сродство OI-Chol<sup>+</sup>I<sup>-</sup> и OI-Chol<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup> и диолеоильных аналогов DOGG-Chol<sup>+</sup>I<sup>-</sup> и DOTAP<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup> к мышечному типу рецепторов (диапазон IC<sub>50</sub> = 32.5–56 мкМ) оказалось в 2.0–5.5 раза выше, чем к  $\alpha 7$  нАХР человека (диапазон IC<sub>50</sub> = 62–178 мкМ) (табл. 1). При этом олеоилхолин иодид в 2 раза более эффективно взаимодействовал с ортостерическим сайтом связывания мышечного и  $\alpha 7$  нАХР (IC<sub>50</sub> = 37 и 62 мкМ соответственно), чем в форме мезилата (IC<sub>50</sub> = 56 и 129 мкМ соответственно) (табл. 1).

Сродство исследованных нами новых аналогов ацилхолинов (OI-Chol<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup>, DOGG-Chol<sup>+</sup>I<sup>-</sup>, DOTAP<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup>) к нАХР мышечного типа из электрического органа ската *T. californica*, оцененное методом радиолигандного анализа (IC<sub>50</sub> = 32.5–56 мкМ) (рис. 2 и табл. 1), определялось в том же диапазоне, что и сродство исследованных нами ранее эндогенно представленных ацилхолинов (арахидоноилхолин, олеоилхолин, линоленоилхолин и докозагексаеноилхолин) (IC<sub>50</sub> = 18.7–93 мкМ) [5]. Интересно, что новые соединения обладали меньшим сродством (129–178 мкМ) к нейрональному  $\alpha 7$  подтипу нАХР человека, чем ранее изученные (14.2–80 мкМ) [5]. В нашей работе впервые показано влияние природы противоиона соответствующего ацилхолина на эффективность его взаимодействия с рецептором: иодид олеоилхолина обладал примерно в 2 раза более высоким сродством, чем его мезилат (табл. 1).



**Рис. 2.** Зависимость специфического связывания радиоактивного [<sup>125</sup>I]- $\alpha$ Vgt с мышечным нАХР ската *Torpedo californica* (А) и  $\alpha 7$  нАХР человека (Б) от концентрации исследуемых ацилхолинов и их диолеоильных аналогов. Каждая точка на графиках представляет собой среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего,  $n = 2-3$

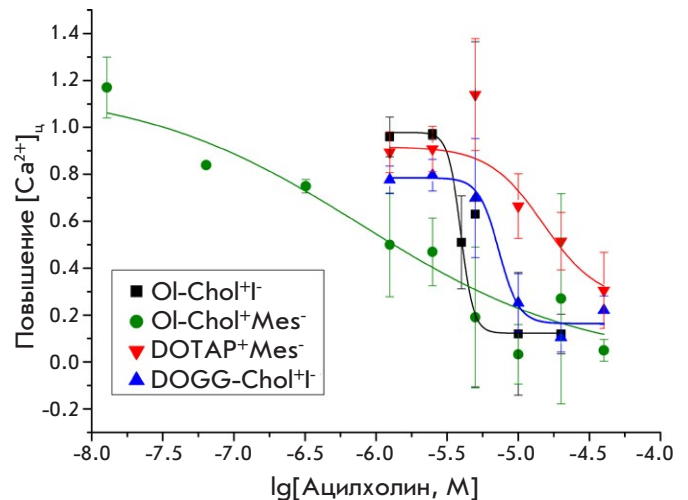
**Таблица 1.** Сродство аналогов ацилхолинов к двум подтипам нАХР, представленное в виде значений  $IC_{50}$  (мкМ), рассчитанных на основании данных радиолигандного анализа и  $Ca^{2+}$ -имиджинга

Ацилхолины	нАХР <i>T. californica</i>		$\alpha 7$ нАХР	
	Радиолигандный анализ, $IC_{50}$ (мкМ)	Радиолигандный анализ, $IC_{50}$ (мкМ)	$Ca^{2+}$ -имиджинг, $IC_{50}$ (мкМ)	
Ol-Chol <sup>+</sup> I <sup>-</sup>	37 ± 1	62 ± 4	3.95 ± 0.18	
Ol-Chol <sup>+</sup> Mes <sup>-</sup>	56 ± 2	129 ± 8	0.79 ± 2.24	
DOGG-Chol <sup>+</sup> I <sup>-</sup>	50 ± 3	151 ± 4	7.32 ± 2.97	
DOTAP <sup>+</sup> Mes <sup>-</sup>	32.5 ± 3.5	178 ± 8	14.99 ± 9.10	

С помощью радиолигандного анализа было показано, что все исследованные аналоги ацилхолинов взаимодействуют с  $\alpha 7$  нАХР. Далее методом кальциевого имиджинга изучили их способность ингибировать функциональные ответы рецептора данного подтипа. Для этого использовали клетки нейробластомы SH-SY5Y, эндогенно экспрессирующие  $\alpha 7$  и некоторые другие подтипы нАХР [21]. Все исследованные соединения были способны ингибировать клеточные ответы, вызванные активацией  $\alpha 7$  нАХР с помощью PNU282987, специфического агониста этого рецептора, в присутствии позитивного аллостерического модулятора PNU120596 (рис. 3). Наиболее эффективным ингибитором оказался олеоилхолин мезилат ( $IC_{50} = 0.79$  мкМ), в форме иодида его эффективность снижалась в 5 раз (рис. 3, табл. 1). DOGG-Chol<sup>+</sup>I<sup>-</sup> и DOTAP<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup> уступали Ol-Chol<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup> по эффективности в 9 и 19 раз соответственно (рис. 3, табл. 1).

В нашей работе впервые показана существенная разница в ингибиторной активности олеоилхолина в отношении нАХР в зависимости от его солевой формы. Мезилат олеоилхолина обладал не только наибольшим сродством к  $\alpha 7$  нАХР, но его кривая кальциевого ответа имела гораздо более пологую форму (рис. 3, табл. 1). Так, он был эффективен уже в субмикромольном диапазоне концентраций ( $IC_{20} \sim 0.1$  мкМ,  $IC_{50} = 0.8$  мкМ), тогда как остальные соединения, исследованные в настоящей (Ol-Chol<sup>+</sup>I<sup>-</sup>, DOGG-Chol<sup>+</sup>I<sup>-</sup>, DOTAP<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup>) и в ранее опубликованной (иодида арахидоноилхолина, линоленоилхолина и докозагексаеноилхолина) наших работах, были активны только в микромолярном диапазоне концентраций (2–15 мкМ) (табл. 1) [5].

В радиолигандном анализе, в котором оценивали взаимодействие веществ с ортостерическим участком связывания лигандов, сродство всех исследованных соединений к  $\alpha 7$  нАХР оказалось заметно ниже, чем при функциональном ингибировании этого рецептора, измеренном методом кальциевого имиджинга (табл. 1). Это свидетельствует о других молекулярных механизмах ингибиторного действия аналогов ацилхолинов, возможно, посредством вза-

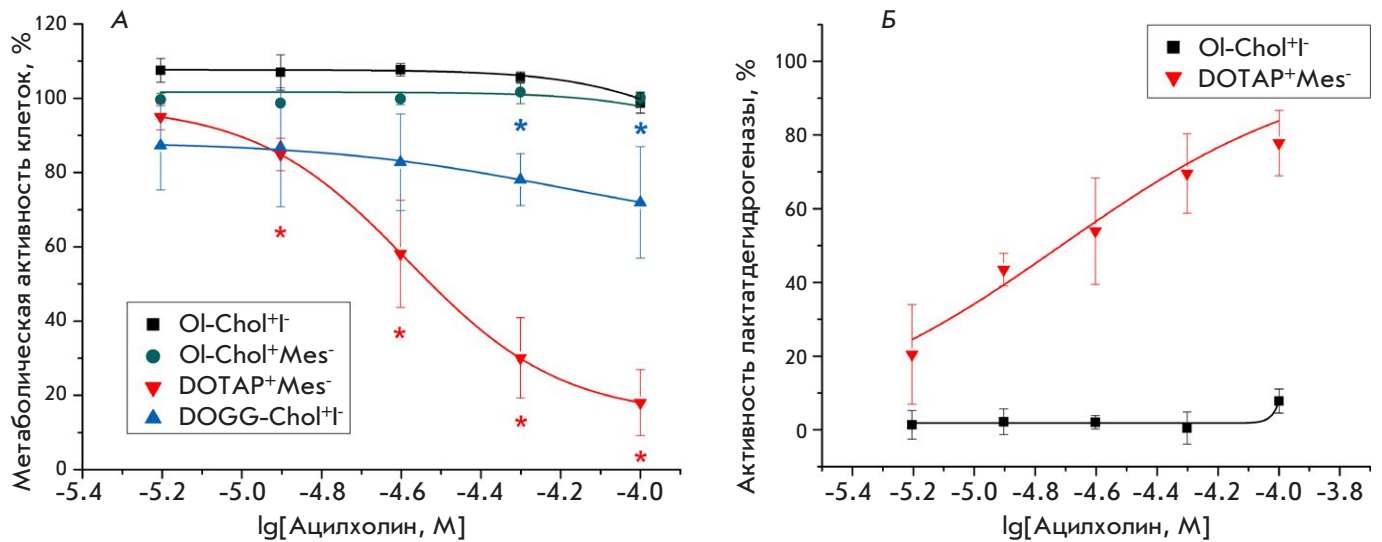


**Рис. 3.** Ингибирование аналогами ацилхолинов кальциевых ответов, вызванных активацией  $\alpha 7$  нАХР специфическим агонистом PNU282987 (200 нМ) в клетках нейробластомы SH-SY5Y. Рассчитанные параметры ингибирования ( $IC_{50}$ ) приведены в табл. 1. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение,  $n = 4-6$

имодействия с аллостерическими участками связывания рецептора. Следует отметить, что усложнение структуры липофильной части аналогов олеоилхолина (DOGG-Chol<sup>+</sup>I<sup>-</sup> и DOTAP<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup>) путем введения дополнительного остатка олеиновой кислоты приводило к снижению сродства этих веществ к рецептору как в радиолигандном анализе (рис. 2, табл. 1), так и в экспериментах по кальциевому имиджингу (рис. 3, табл. 1). Вероятно, такое усложнение структуры создает стерические затруднения для связывания лиганда с рецептором.

### Влияние олеоилхолина и его диолеоильных аналогов на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток нейробластомы SH-SY5Y

Если для оценки функциональной активности олеоилхолинов и их диолеоильных аналогов в отношении  $\alpha 7$  нАХР необходимо несколько минут,



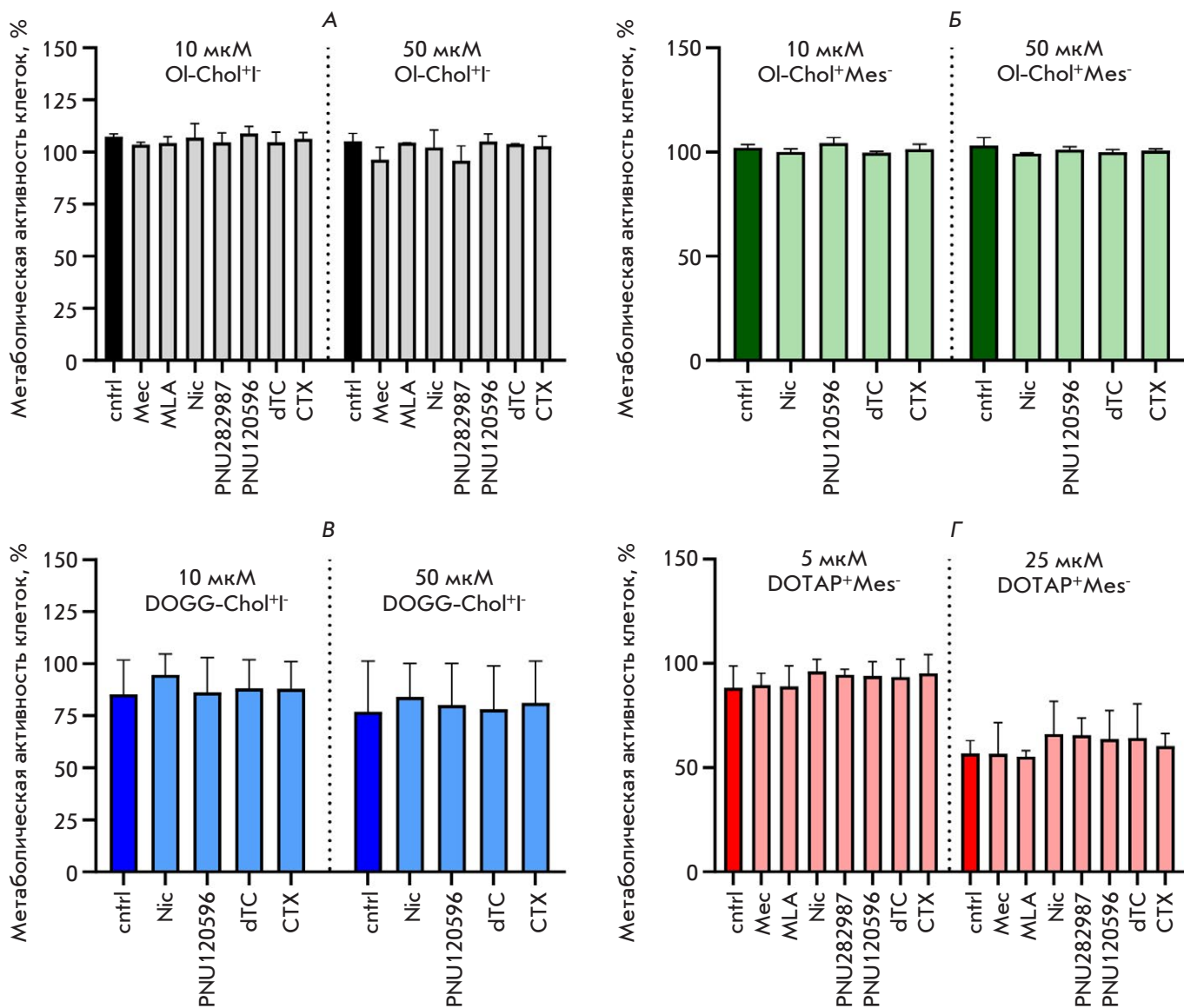
**Рис. 4.** Влияние Ol-Chol<sup>+</sup>I<sup>-</sup>, Ol-Chol<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup>, DOGG-Chol<sup>+</sup>I<sup>-</sup> и DOTAP<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup> на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток SH-SY5Y. Клетки инкубировали с различными концентрациями веществ в течение 72 ч. А – клеточную метаболическую активность определяли с помощью резазуринового теста. Б – цитотоксичность DOTAP<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup> и Ol-Chol<sup>+</sup>I<sup>-</sup> – по активности внеклеточной лактатдегидрогеназы. Данные приведены как среднее значение ± стандартное отклонение, n = 3. \*p < 0.05 по сравнению с контрольными значениями, U-критерий Манна–Уитни

то для направленной внутриклеточной доставки нуклеиновых кислот и подобных им соединений время инкубации катионных липидов с клетками увеличивают до нескольких часов и даже суток. В этой связи далее оценивали длительное влияние (в течение 72 ч) олеоилхолинов и аналогов DOGG-Chol<sup>+</sup>I<sup>-</sup> и DOTAP<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup> на жизнеспособность и пролиферацию популяции клеток нейробластомы SH-SY5Y, в том числе проверяли и зависимость наблюдаемых эффектов от активации или ингибирования nAХР с помощью известных агонистов, позитивного аллостерического модулятора и антагонистов. С этой целью жизнеспособность клеток анализировали с использованием резазуринового теста для оценки метаболической активности клеток и определения активности внеклеточной лактатдегидрогеназы для оценки цитотоксичности соединений. Проведенные исследования показали, что олеоилхолин (6.25–100 мкМ) не влиял существенно на жизнеспособность клеток (рис. 4А, Б); соединение DOGG-Chol<sup>+</sup>I<sup>-</sup> во всех использованных концентрациях оказывало цитотоксическое действие (гибель 13–28% клеток, IC<sub>50</sub> > 100 мкМ (рис. 4А)). Цитотоксическое действие катионного липида DOTAP<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup> имело ярко выраженную концентрационную зависимость (IC<sub>50</sub> = 26.18 ± 0.16 мкМ в резазуриновом тесте (рис. 4А) и 19.28 ± 5.64 мкМ в LDH-тесте (рис. 4Б)).

Ранее нами было показано [5], что инкубация клеток аденокарциномы легкого А549 с олеоилхолини-

одидом (100 мкМ, 24 ч) приводила к концентрационно-зависимому угнетению их жизнеспособности за счет индукции апоптоза, которое достигало 45%. Эти клетки экспрессируют α7 nAХР [22], однако маловероятно, что наблюдаемый эффект реализуется через этот подтип рецептора, так как его специфический ингибитор метилликаконитин (10 мкМ) не влиял на цитотоксическое действие олеоилхолина [5].

В настоящей работе мы проверили, реализуются ли обнаруженные долговременные эффекты исследуемых катионных липидов на выживаемость клеток нейробластомы SH-SY5Y через взаимодействие этих соединений с nAХР. Для этого клетки SH-SY5Y инкубировали в течение 72 ч с исследуемыми липидами в двух концентрациях, не превышающих IC<sub>50</sub> их цитотоксического действия (10 и 50 мкМ для Ol-Chol<sup>+</sup>I<sup>-</sup>, Ol-Chol<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup>, DOGG-Chol<sup>+</sup>I<sup>-</sup>, а также 5 и 25 мкМ для DOTAP<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup>), в присутствии ряда специфических лигандов nAХР (рис. 5). Клетки SH-SY5Y экспрессируют как гомопентамерный α7 nAХР, так и ряд гетеропентамерных nAХР, содержащих в своем составе комбинации α3-, α5-, β2- и β4-субъединиц [21]. Проведенные опыты показали, что ни неселективные агонисты (никотин) и антагонисты (мекамиламин и d-тубокурарин), ни специфические лиганды α7 nAХР, такие как агонист PNU282987, позитивный аллостерический модулятор PNU120596 или такие антагонисты, как метилликаконитин и α-кобротоксин, не влия-



**Рис. 5.** Влияние лигандов nAHP на долговременные эффекты, оказываемые OI-Chol<sup>+</sup>I<sup>+</sup> (A), OI-Chol<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup> (Б), DOGG-Chol<sup>+</sup>I<sup>+</sup> (B) и DOTAP<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup> (Г) на метаболическую активность клеток SH-SY5Y в течение 72 ч. Использовали следующие лиганды nAHP: никотин (Nic), мекамилламин (Mec), d-тубокурарин (d-TC) и метилликаконитин (MLA) в концентрации 100 мкМ; PNU120596 и PNU282987 в концентрации 10 мкМ; α-кобраторксин (CTX) – 1 мкМ. Данные приведены относительно значений метаболической активности интактных клеток SH-SY5Y. Cntrl – относительная метаболическая активность клеток в присутствии указанной концентрации OI-Chol<sup>+</sup>I<sup>+</sup> (A), OI-Chol<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup> (Б), DOGG-Chol<sup>+</sup>I<sup>+</sup> (B) и DOTAP<sup>+</sup>Mes<sup>-</sup> (Г). Данные приведены как среднее значение ± стандартное отклонение, n = 3. \*p < 0.05, U-критерий Манна–Уитни, по сравнению с контрольными значениями

ли на эффекты исследуемых соединений на клетки SH-SY5Y (рис. 5).

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Ацилированные холины – недавно открытый и еще мало изученный класс эндогенных жирнокислотных аналогов ацетилхолина. Ранее мы показали, что холиновые эфиры ненасыщенных жирных кислот являются модуляторами ацетилхолиновой системы.

Продолжая эти исследования, в настоящей работе на примере олеoilхолина, проявившего по результатам предыдущих экспериментов наибольшую активность в ингибировании α7 nAHP, впервые показано, что противоион четвертичной аммониевой группы существенно влияет на способность соединения взаимодействовать с nAHP. По данным радиолигандного анализа связывания [<sup>125</sup>I]-αBgт с ортостерическим сайтом связывания nAHP иодид

олеоилхолина в 2 раза более эффективно, чем мезилат взаимодействовал с мышечным и нейрональным  $\alpha 7$  nAChR. Эти результаты показывают, что в условиях биологического эксперимента в рабочем буферном растворе не происходит замена противоиона на хлорид, несмотря на его избыток, а размер противоиона, по-видимому, существенно влияет на взаимодействие ацилхолина с ортостерическим участком связывания ацетилхолина на рецепторе. С помощью кальциевого имиджинга, фиксирующего функциональный ответ клеток на активацию nAChR, показано, что обе солевые формы олеоилхолина (иодид и мезилат) оказались заметно более эффективными ингибиторами  $\alpha 7$  nAChR ( $IC_{50} = 3.95$  и  $0.79$  мкМ соответственно), чем это проявилось в опытах по конкуренции с  $[^{125}I]-\alpha Bgt$ . Можно предположить, что в данном случае усиление ингибирующей активности олеоилхолинов связано с их дополнительным взаимодействием с аллостерическими участками связывания на молекуле рецептора, которое не фиксируется радиолигандным методом анализа.

Важный результат настоящего исследования – обнаружение способности ингибировать nAChR как мышечного, так и нейронального типа у катионного липида DOTAP, широко используемого в составе липидных наночастиц для доставки нуклеиновых кислот в клетки млекопитающих. Несмотря на то, что по активности DOTAP уступал олеоилхолину, способность данного катионного липида модулировать активность рецепторов ацетилхолиновой системы следует учитывать при создании лекарственных препаратов с его участием. В отличие от олеоилхолина липофильная часть DOTAP содержит два остатка олеиновой кислоты. Мы синтезировали аналог олеоилхолина, в котором липофильная часть также содержала два остатка олеиновой кислоты в составе 1,2-диацилглицерина, а холиновая груп-

па была отделена от липофильной части линкером на основе ГАМК (DOG-G-Chol<sup>+</sup>I<sup>-</sup>). Как и в случае DOTAP, по данным радиолигандного анализа и функционального ответа в экспериментах кальциевого имиджинга, этот аналог также проявлял сродство к  $\alpha 7$  nAChR, но заметно уступал по активности олеоилхолину. DOGG-Chol<sup>+</sup>I<sup>-</sup> и DOTAP<sup>+</sup>MeS<sup>-</sup>, в отличие от олеоилхолина, усиливающего пролиферацию клеток нейробластомы SH-SY5Y, оказывали выраженное цитотоксическое действие на эти клетки. Этот эффект, однако, не был опосредован взаимодействием с nAChR, так как специфические лиганды nAChR оказались не в состоянии его заблокировать.

Таким образом, холиновая группа в составе всех исследуемых ацилхолинов придает им свойства ингибиторов nAChR, а усложнение структуры липофильной части молекулы путем введения дополнительного остатка олеиновой кислоты снижает ингибирующую активность, но усиливает их цитотоксическое действие по независимому от nAChR механизму. ●

*Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования РФ (номер соглашения 075-15-2024-536).*

*Благодарности. Авторы выражают благодарность Е.Л. Водовозовой (ФГБУН ГНЦ ИБХ РАН) за предоставление образца диолеоилглицерида. Благодарность за предоставление препарата мембран электрического органа ската *Torpedo californica* авторы выражают Ф. Хухо, Свободный университет Берлина, Германия. Также авторы признательны компании Eli Lilly, Великобритания, за предоставленную суспензию клеток GH4C1.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zarei I, Oppel RC, Borresen EC, et al. Modulation of plasma and urine metabolome in colorectal cancer survivors consuming rice bran. *Integr Food Nutr Metab.* 2019;6(3):10. doi: 10.15761/IFNM.1000252
- Vorkas PA, Isaac G, Anwar MA, et al. Untargeted UPLC-MS profiling pipeline to expand tissue metabolome coverage: application to cardiovascular disease. *Anal Chem.* 2015;87(8):4184-4193. doi: 10.1021/ac503775m
- Vorkas PA, Shalhoub J, Isaac G, et al. Metabolic phenotyping of atherosclerotic plaques reveals latent associations between free cholesterol and ceramide metabolism in atherogenesis. *J Proteome Res.* 2015;14(3):1389-1399. doi: 10.1021/pr5009898
- Zeleznik OA, Poole EM, Lindstrom S, et al. Metabolomic analysis of 92 pulmonary embolism patients from a nested case-control study identifies metabolites associated with
- adverse clinical outcomes. *J Thromb Haemost.* 2018;16(3):500-507. doi: 10.1111/jth.13937
- Akimov MG, Kudryavtsev DS, Kryukova EV, et al. Arachidonoylcholine and Other Unsaturated Long-Chain Acylcholines Are Endogenous Modulators of the Acetylcholine Signaling System. *Biomolecules.* 2020;10(2):283. doi: 10.3390/biom10020283
- Arunrungvichian K, Vajragupta O, Hayakawa Y, Pongrakhananon V. Targeting Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptors in Lung Cancer: Insights, Challenges, and Therapeutic Strategies. *ACS Pharmacol Transl Sci.* 2024;7(1):28-41. doi: 10.1021/acspsci.3c00138
- Gretskaya N, Akimov M, Andreev D, et al. Multicomponent Lipid Nanoparticles for RNA Transfection. *Pharmaceutics.* 2023;15(4):1289. doi: 10.3390/pharmaceutics15041289
- Ponti F, Campolungo M, Melchiori C, et al. Cationic lipids for gene delivery: many players, one goal. *Chem Phys*

- Lipids*. 2021;235:105032. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2020.105032
9. Simberg D, Weisman S, Talmon Y, Barenholz Y. DOTAP (and other cationic lipids): chemistry, biophysics, and transfection. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2004;21(4):257-317. doi: 10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v21.i4.10
10. Cecchini M, Corringer PJ, Changeux JP. The Nicotinic Acetylcholine Receptor and Its Pentameric Homologs: Toward an Allosteric Mechanism of Signal Transduction at the Atomic Level. *Annual Review of Biochemistry*. 2024;93(1):339-366. doi: 10.1146/annurev-biochem-030122-033116
11. Zoli M, Pucci S, Vilella A, Gotti C. Neuronal and Extraneuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Curr Neuropharmacol*. 2018;16(4):338-349. doi: 10.2174/1570159X15666170912110450
12. Shelukhina I, Siniavin A, Kasheverov I, et al. alpha7- and alpha9-Containing Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Functioning of Immune System and in Pain. *Int J Mol Sci*. 2023;24(7):6524. doi: 10.3390/ijms24076524
13. Soares AR, Picciotto MR. Nicotinic regulation of microglia: potential contributions to addiction. *J Neural Transm (Vienna)*. 2024;131(5):425-435. doi: 10.1007/s00702-023-02703-9
14. Roa-Vidal N, Rodriguez-Aponte AS, Lasalde-Dominicci JA, et al. Cholinergic Polarization of Human Macrophages. *Int J Mol Sci*. 2023;24(21):15732. doi: 10.3390/ijms242115732
15. Ma KG, Qian YH. Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor and its effects on Alzheimer's disease. *Neuropeptides*. 2019;73:96-106. doi: 10.1016/j.npep.2018.12.003
16. Kudryavtsev D, Shelukhina I, Vulfius C, et al. Natural compounds interacting with nicotinic acetylcholine receptors: from low-molecular weight ones to peptides and proteins. *Toxins*. 2015;7(5):1683-1701. doi: 10.3390/toxins7051683
17. Ivanov IA, Siniavin AE, Palikov VA, et al. Analogs of 6-Bromohypaphorine with Increased Agonist Potency for alpha7 Nicotinic Receptor as Anti-Inflammatory Analgesic Agents. *Mar Drugs*. 2023;21(6):368. doi: 10.3390/md21060368
18. Severyukhina MS, Ojomoko LO, Shelukhina IV, et al. Non-conventional toxin WTX and its disulfide-fixed synthetic fragments: Interaction with nicotinic acetylcholine receptors and reduction of blood pressure. *Int J Biol Macromol*. 2025;288:138626. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.138626
19. Безуглов ВВ, Зинченко ГН, Никитина ЛА, Бузников ГА. Арахидоноилхолин и N,N-диметиламиноэтиларихидонат – новые холинэргические вещества. *Биорг. химия*. 2001;27(3):227-230. doi: 10.1023/a:1011341623358
20. Massing U, Kley JT, Gurtesch L, Fankhaenel S. A simple approach to DOTAP and its analogs bearing different fatty acids. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2000;105(2):189-191. doi: 10.1016/s0009-3084(00)00121-3
21. Peng X, Gerzanich V, Anand R, et al. Chronic nicotine treatment up-regulates alpha3 and alpha7 acetylcholine receptor subtypes expressed by the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Mol Pharmacol*. 1997;51(5):776-784. doi: 10.1124/mol.51.5.776
22. Mucchietto V, Fasoli F, Pucci S, et al. alpha9- and alpha7-containing receptors mediate the pro-proliferative effects of nicotine in the A549 adenocarcinoma cell line. *Br J Pharmacol*. 2018;175(11):1957-1972. doi: 10.1111/bph.13954