

УТВЕРЖДАЮ:

Генеральный директор ФГАНУ  
«Федеральный научный центр  
исследований и разработки  
иммунобиологических препаратов РАН»  
(Институт полиомиелита)

член-корреспондент РАН, профессор,  
доктор медицинских наук

А.А. Ишмухаметов

2022 г.



**ОТЗЫВ**

**ведущей организации на диссертационную работу  
Синявина Андрея Эдуардовича  
« $\alpha$ -Нейротоксины и фосфолипазы A2 змеиных ядов в исследовании  
процессов репродукции вирусов и патогенеза воспаления»,  
представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук  
по специальности 1.4.9. – «Биоорганическая химия».**

Диссертационная работа А.Э. Синявина выполнена в Отделе молекулярной нейроиммунной сигнализации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН). Диссертация изложена на 181 странице, иллюстрирована 41 рисунком, включает 2 таблицы. Список литературы насчитывает 285 источников. Диссертационная работа построена по стандартному принципу, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования и обсуждения; рукопись завершается выводами, списком литературы и приложением. По теме диссертации опубликовано 10 работ, в их числе 7 статей в рецензируемых научных журналах, внесенных в перечень изданий, утвержденных Высшей аттестационной комиссией Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, и 3 тезисов докладов в сборниках материалов международных конференций в период 2018-2021 гг.

**Актуальность проблемы**

Сигналы блуждающего нерва передаются на цитокин-продуцирующие клетки, экспрессирующие  $\alpha 7$  никотиновый ацетилхолиновый рецептор (nAChR).  $\alpha 7$ -nAChR является важным компонентом холинергического противовоспалительного пути. Этот

недавно обнаруженный путь, связывающий нервную и иммунную систему, является быстрым механизмом, который может подавлять цитокиновый ответ, защищая организм от избытка цитокинов, который может вызывать патофизиологию многих заболеваний. Агонисты  $\alpha 7$ -нАХР ингибируют высвобождение провоспалительных цитокинов и защищают организм в различных экспериментальных моделях летального воспаления. Хотя потенциальный противовоспалительный эффект классических лигандов никотиновых рецепторов, таких как ацетилхолин и никотин, был показан ранее, фармакологическую модуляцию холинергического пути селективными агонистами  $\alpha 7$ -нАХР еще предстоит выяснить. Помимо этого, в недавних исследованиях показано, что различные лиганды нАХР эффективно блокируют АТФ-зависимое высвобождение IL-1 $\beta$  из моноцитов, тем самым указывая на возможные взаимодействия нАХР и пуринергических рецепторов P2X7. Однако, вероятное перекрестное взаимодействие нАХР и P2X7 рецепторов остается неизученным. С практической точки зрения модуляцию холинергического противовоспалительного пути можно использовать с терапевтической пользой для лечения заболеваний, вызванных чрезмерной активностью цитокинов.

Змеиный яд может содержать более сотни различных белков, в основном принадлежащий к небольшому количеству структурных суперсемейств, но с различными физиологическими мишенями и фармакологическими эффектами. Одними из компонентов змеиного яда являются  $\alpha$ -нейротоксины, способные с высокой аффинностью связываться с определенными подтипами нАХР.

Другими компонентами змеиного яда, обладающими ферментативной активностью, являются фосфолипазы А2 (ФЛА2). Исследования показывают, что некоторые змеиные ФЛА2 взаимодействуют и с  $\alpha 7$ -нАХР, а также проявляют различные биологические эффекты, что делает их важным источником для создания потенциальных терапевтических агентов. ФЛА2 представляют собой группу ферментов, расщепляющих sn-2-ацильную связь в мембраносвязанных фосфолипидах, что приводит к образованию различных классов липидных медиаторов. ФЛА2 представляют собой широко распространенные ферменты, принимающие участие в различных биологических путях, включая рост и дифференцировку клеток. ФЛА2 млекопитающих в основном усиливают пролиферацию опухолевых клеток, в то время как ФЛА2 змеиного яда способны ее подавлять. ФЛА2, обладающие

антипролиферативным действием, могут реализовывать свои эффекты посредством взаимодействия с рецепторами факторов роста и интегринами. Применение ФЛА2 для изучения антипролиферативных эффектов может способствовать открытию нового биохимического механизма ингибирования роста опухолевых клеток. С другой стороны, ФЛА2, полученные из ядовитых змей, обладают ингибирующей активностью против вирусов Денге и жёлтой лихорадки за счет разрушения липидных бислоев вирусной оболочки, а ФЛА2 человека также проявляет вирулицидную активность против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Таким образом, ФЛА2 из змеиного яда могут быть использованы для разработки противовирусных препаратов широкого спектра действия.

Суммируя приведённые факты, ФЛА2 и  $\alpha$ -нейротоксины являются многообещающими агентами в исследовании воспалительных процессов, так как первые обладают различными биологическими свойствами и участвуют в иммунных реакциях, а вторые специфически взаимодействуют с  $\alpha 7$ -нАХР, играющих противовоспалительную роль.

В связи с этим диссертация А.Э. Синявина посвящена исследованиям в двух направлениях: целью первого являлось изучение функциональной активности и биологической роли  $\alpha 7$ -нАХР на макрофагах, а также взаимосвязи нАХР с P2X7 рецепторами в контексте воспалительных процессов, включая дифференциальную оценку экспрессии  $\alpha 7$ -нАХР на различных клетках с использованием такого  $\alpha$ -нейротоксина, как  $\alpha$ -бунгаротоксин; целью второго стало исследование цитотоксической и противовирусной активности ряда змеиных ФЛА2. Оба направления исследований являются актуальными.

### **Значение диссертационной работы**

Для достижения цели работы автору необходимо было решить следующие задачи:

1. Исследовать экспрессию мРНК различных субъединиц нАХР и функциональных  $\alpha 7$ -рецепторов в макрофагах человека с использованием комбинации методов ПЦР, кальциевого имиджинга, цитохимического окрашивания флуоресцентным аналогом  $\alpha$ -бунгаротоксина и электрофизиологии;

2. Оценить профиль экспрессии макрофагальных мембранных маркеров (CD54, CD11b, CD14, HLA-DR) при активации  $\alpha 7$ -рецепторов с использованием PNU 282987, селективного агониста  $\alpha 7$ -рецепторов;
3. Определить продукции цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10) при активации  $\alpha 7$ -рецепторов с помощью PNU 282987 в LPS-стимулированных макрофагах;
4. Исследовать влияние классических лигандов nAXP на активность P2X7 рецепторов в тучных клетках и макрофагах в контексте холинергического противовоспалительного пути;
5. Исследовать механизмы цитотоксичности и противовирусной активности различных змеиных ФЛА2 в отношении ВИЧ и возбудителя COVID-19 – SARS-CoV-2.

В последовательных сериях экспериментальных исследований эти задачи были решены. А.Э. Синявиным показана экспрессия  $\alpha 7$ -nAXP на макрофагах человека, дифференцированных из моноцитов периферической крови, и описаны профили экспрессии клеточных маркёров таких как HLA-DR и CD14, участвующих в воспалении, а также CD11b и CD54, участвующих в межклеточных взаимодействиях; и продукции основных цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-10 при активации этих рецепторов в норме и при воспалении. Также исследована роль холинергических лигандов  $\alpha 7$ -nAXP на АТФ-зависимую функциональную активность P2X7 рецепторов тучных клеток и показано, что агенты не действуют на функциональную активность P2X7 рецепторов, но могут опосредовать противовоспалительный эффект через механизм лежащий после АТФ-управляемой передачи сигналов.

Дальнейшие эксперименты были посвящены исследованию противоопухолевой и противовирусной активности компонентов змеиных ядов. Для этого диссертантом проводилось фракционирование ядов с последующей характеристикой фракций. Проведена оценка противоопухолевой активности полученных фракций в клетках аденокарциномы молочной железы MCF7 и аденокарциномы лёгких A549, и обнаружена ФЛА2 из яда крайта *Bungarus fasciatus*, которая обладает цитотоксическим действием по отношению к опухолевым клеткам человека. Противовирусная активность восьми фосфолипаз А2 ядов крайта *Bungarus fasciatus*, гадюк *Vipera ursinii renardi* и *V. nikolskii* была исследована против вируса SARS-CoV-2 и вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) – РНК-содержащих оболочечных вирусов. Была показана

противовирусная активность *in vitro* для ФЛА2 из яда гадюки *V. nikolskii* против различных штаммов обоих вирусов. Был изучен механизм ингибирования репродукции SARS-CoV-2, показано разрушение оболочки и грубое искажение ультраструктуры вириона, которые, вероятно, вызваны гидролизом липидов в вирусной мембране под воздействием ФЛА2. С другой стороны, с использованием рекомбинантного белка рецептор-связывающего домена RBD SARS-CoV-2 показано ингибирование связывания RBD с рецептором ACE2 в присутствии данной ФЛА2.

Результаты диссертационной работы имеют несомненную научную новизну: впервые показано, что макрофаги человека экспрессируют функциональный рецептор  $\alpha 7$ -nAChR, при этом его активация увеличивает экспрессию мембранных белков HLA-DR, CD11b и CD54 и снижает экспрессию мембранного рецептора CD14 и продукцию цитокина IL-10, что показывает важную роль  $\alpha 7$ -nAChR в снижении иммуносупрессивного состояния, которое развивается в процессе воспаления. Впервые выявлена противовирусная активность димерных фосфолипаз A2, выделенных из яда гадюки Никольского *Vipera nikolskii*, против SARS-CoV-2 – возбудителя COVID-19, а также различных субтипов ВИЧ. Кроме того, предложен механизм ингибирующего действия данных ферментов в отношении SARS-CoV-2 через снижение связывания поверхностного белка вириона RBD с клеточным рецептором ACE2 и инактивацию вируса в результате нарушения морфологической целостности вирусных частиц.

Представленная рукопись диссертационной работы А.Э. Синявина позволяет заключить следующее:

Полученные результаты соответствуют цели исследования и его задачам. Они имеют теоретическую и практическую значимость, понимания развития процессов воспаления и открывая новые возможности для подбора методов лечения пациентов с сепсис–опосредованной иммуносупрессией, также, полученные данные о противовирусной активности фосфолипаз A2 из змеиного яда, создаёт основу для разработки противовирусных средств против социально-значимых инфекций.

Содержание автореферата соответствует содержанию диссертационной рукописи.

Содержание опубликованных работ соответствует содержанию диссертации.

Рукопись диссертации хорошо оформлена, логично структурирована, материал изложен чётко, стилем, принятым для научных публикаций.

Тема диссертации соответствует научной специальности 1.4.9. – биоорганическая химия (химические науки).

Научные положения, выносимые на защиту, отражены в опубликованных работах.

#### **Степень достоверности и обоснованности представленных данных**

Достоверность и обоснованность представленных в диссертационной работе данных обусловлена применением автором современных методических подходов для решения поставленных задач. Используются современные клеточные, молекулярно-биологические и биофизические методы, включая проточную цитометрию, микроэлектрофизиологические исследования, конструирование инфекционных вирусных клонов (псевдовирусов), трансмиссионную микроскопию. Данные, полученные этими методами, были надлежащим образом обработаны статистическими методами. Проанализированный объем научного исследования как в качественном, так и в количественном отношении адекватен задачам исследования. Методы исследования, оборудование, реактивы, расходные материалы подробно и чётко описаны в главе Материалы и методы. Рисунки и таблицы рукописи диссертации и автореферата в полной мере отражают суть экспериментов, их количественные характеристики и статистическую обработку полученных результатов. Представленные в работе результаты получены на достаточном объёме экспериментальных данных и проанализированы с использованием адекватно подобранных методов статистики. Автором проведён сравнительный анализ собственных данных с результатами мировой научной литературы. Выводы соответствуют поставленным задачам и отражают их решение. Интерпретация полученных данных является оригинальной и обоснованной.

Все это в совокупности позволяет заключить, что представленная диссертационная работа А.Э. Синявина является самостоятельным, оригинальным, завершённым в рамках поставленной цели и задач научно-квалификационным трудом.

#### **Анализ достоверности выводов**

Результаты диссертационной работы оформлены в виде 7 выводов, которые в полной мере отражают суть выполненной работы, обоснованы полученными результатами, корректно сформулированы.

#### **Замечания и вопросы по диссертации А.Э. Синявина**

По рассматриваемой диссертации есть следующие замечания:

- 1) Некорректным является написание в задачах работы «экспрессии профиля мембранных маркеров», корректнее употреблять термин «профиль экспрессии маркеров»;
- 2) При оценке противоопухолевой активности *in vitro* целесообразно рассчитывать 50% токсическую концентрацию (CC<sub>50</sub>) для проведения численной оценки активности и возможности сравнения тестируемых препаратов между собой;
- 3) При оценке противовирусной активности *in vitro* целесообразно рассчитывать индекс селективности (SI) для оценки соотношения между токсичностью и активностью исследуемых препаратов.

По диссертации имеется вопрос:

В разделе 3.3.1 главы Результаты описано фракционирование и выделение фосфолипаз А2 (ФЛА2) из змеиных ядов путём гель-фильтрации и обращенно-фазовой хроматографии. В процессе характеристики полученных фракций MALDI масс-спектрометрией указано наличие 2х пиков в таргетной фракции. Чему соответствует первый пик с  $m/z$  6500 и почему этим компонентом можно пренебречь при изучении противоопухолевой и противовирусной активности?

### **Заключение**

Диссертационная работа Синявина Андрея Эдуардовича на тему « $\alpha$ -Нейротоксины и фосфолипазы А2 змеиных ядов в исследовании процессов репродукции вирусов и патогенеза воспаления», выполненная под руководством доктора химических наук, профессора, чл.-корр. РАН Виктора Ионовича Цетлина, и представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – «Биоорганическая химия», является законченным научно-квалификационным исследованием, в котором содержится решение важных научных задач – изучены некоторые аспекты функционирования и роль  $\alpha 7$ -nAХР в воспалительных процессах, а также показана противоопухолевая и противовирусная активность ФЛА2 змеиных ядов. Результаты работы вносят значительный вклад в изучение фундаментальной проблемы – функциональной роли различных компонентов процесса воспаления, а также расширяют химическое пространство противоопухолевых и противовирусных соединений. Отзыв обсужден и принят на межлабораторном заседании отдела актуальных и вновь возникающих инфекций с пандемическим потенциалом ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических

препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) (Протокол № 4 от «18» мая 2022 года).

### Соответствие диссертации требованиям ВАК.

По своей актуальности, научной значимости, объему выполненных исследований, новизне полученных результатов и научных положений диссертация Синявина Андрея Эдуардовича на тему « $\alpha$ -Нейротоксины и фосфолипазы А2 змеиных ядов в исследовании процессов репродукции вирусов и патогенеза воспаления» полностью соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением 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; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539), предъявляемым к кандидатским и докторским диссертациям, а ее автор Синявин А.Э., заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9. – «Биоорганическая химия».

Отзыв подготовил:

Ведущий научный сотрудник лаборатории полиомиелита и других энтеровирусных инфекций с референс-центром ВОЗ по надзору за полиомиелитом ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), доцент кафедры организации и технологии производства иммунобиологических препаратов Института фармации и трансляционной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

кандидат биологических наук (03.02.02 – Вирусология)

e-mail: kozlovskaya\_li@chumakovs.su

тел: 8 (495) 841-90-14 доб. 3137

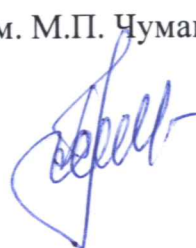


Л.И. Козловская

Подпись к.б.н. Л.И. Козловской удостоверяю

Ученый секретарь ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»

(Институт полиомиелита)  
кандидат биологических наук



А.В. Белякова

«10» мая 2022 года

Федеральное государственное автономное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита)

Адрес: поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1, город Москва, 108819. Тел./факс 8 (495) 841-90-02; 8 (495) 549-67-60; 8 (495) 841-93-21. E-mail: sue\_polio@chumakovs.su, <http://www.chumakovs.ru>