



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ  
ИМ. АКАДЕМИКОВ М.М. ШЕМЯКИНА И Ю.А. ОВЧИННИКОВА  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

## **СТЕНОГРАММА**

заседания диссертационного совета 24.1.037.01

15 июня 2022 года

Защита диссертации

на соискание учёной степени кандидата химических наук

**Синявиным Андреем Эдуардовичем**

по теме: « $\alpha$ -НЕЙРОТОКСИНЫ И ФОСФОЛИПАЗЫ А2 ЗМЕИНЫХ  
ЯДОВ В ИССЛЕДОВАНИИ ПРОЦЕССОВ РЕПРОДУКЦИИ  
ВИРУСОВ И ПАТОГЕНЕЗА ВОСПАЛЕНИЯ»,

Специальность 1.4.9 - Биоорганическая химия

Москва - 2022 г.

## СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 15 июня 2022 года.

Заместитель председателя диссертационного совета

Профессор, доктор физико-математических наук

Р.Г. Ефремов

Учёный секретарь диссертационного совета

Доктор физико-математических наук

В.А. Олейников

Из 30 членов совета присутствует 20 человек, из них докторов по профилю диссертации – 8.

|                            |                                  |         |
|----------------------------|----------------------------------|---------|
| 1. Д.физ.-мат.н.           | Ефремов Роман Гербертович        | (1.4.9) |
| 2. Д.физ.-мат.н.           | Олейников Владимир Александрович | (1.5.6) |
| 3. Д.б.н.                  | Ажикина Татьяна Леодоровна       | (1.5.3) |
| 4. Д.х.н.                  | Белогуров Алексей Анатольевич    | (1.5.3) |
| 5. Д.х.н.                  | Бовин Николай Владимирович       | (1.5.6) |
| 6. Академик РАН, д.х.н.    | Габибов Александр Габибович      | (1.5.6) |
| 7. Академик РАН, д.б.н.    | Деев Сергей Михайлович           | (1.5.3) |
| 8. Д.х.н.                  | Дзантиев Борис Борисович         | (1.4.9) |
| 9. Д.б.н.                  | Долгих Дмитрий Александрович     | (1.5.3) |
| 10. Академик РАН, д.х.н.   | Донцова Ольга Анатольевна        | (1.5.3) |
| 11. Член-корр. РАН, д.б.н. | Завриев Сергей Кириакович        | (1.5.6) |
| 12. Д.х.н.                 | Зубов Виталий Павлович           | (1.5.6) |
| 13. Д.б.н.                 | Лебедев Юрий Борисович           | (1.5.3) |
| 14. Академик РАН, д.х.н.   | Мирошников Анатолий Иванович     | (1.5.6) |
| 15. Д.х.н.                 | Овчинникова Татьяна Владимировна | (1.4.9) |
| 16. Д.х.н.                 | Смирнов Иван Витальевич          | (1.4.9) |
| 17. Д.х.н.                 | Уткин Юрий Николаевич            | (1.4.9) |
| 18. Член-корр. РАН, д.х.н. | Цетлин Виктор Ионович            | (1.4.9) |
| 19. Д.х.н.                 | Шахпаронов Михаил Иванович       | (1.4.9) |
| 20. Д.х.н.                 | Ямпольский Илья Викторович       | (1.4.9) |

**Ефремов Роман Гербертович:** Уважаемые коллеги! Прошу вас занимать свободные места. Мы начинаем второе заседание в рамках сегодняшнего нашего диссертационного совета по рассмотрению диссертации Синявина Андрея Эдуардовича « $\alpha$ -Нейротоксины и фосфолипазы A2 змеиных ядов в исследовании процессов репродукции вирусов и патогенеза воспаления». Диссертация представляется на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – «Биоорганическая химия». Научный руководитель доктор химических наук, член-корреспондент РАН Цетлин Виктор Ионович. Официальные оппоненты: Костров Сергей Викторович, доктор химических наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор Института молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт». Сергей Викторович в командировке, но отзыв его в деле имеется. И Готтих Марина Борисовна, доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени Белозерского МГУ имени Ломоносова. Ведущая организация: Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени Чумакова Российской академии наук (Институт полиомиелита). Владимир Александрович, ознакомьте, пожалуйста, присутствующих с материалами дела.

**Олейников Владимир Александрович:** У меня в руках как раз фрагмент личного дела. Синявин Андрей Эдуардович, гражданин Российской Федерации. Биографические данные. Окончил с отличием Московский технологический университет. Это МИТХТ имени Ломоносова по специальности «Молекулярная и клеточная биотехнология» в 17-м году. С 19-го года по настоящее время младший научный сотрудник лаборатории молекулярной токсикологии нашего института. С 17-го по 21-й аспирант в нашем институте. Кандидатский экзамен по специальности «Биоорганическая химия» - оценка «отлично». Работа выполнена в отделе молекулярной нейроиммунной сигнализации, опять же, институт ИБХ РАН. Научный руководитель диссертационной работы главный научный сотрудник, доктор химических наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук Виктор Ионович Цетлин. Он зав. отделом молекулярной нейроиммунной сигнализации. По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ. Объявление о защите, автореферат диссертации размещены на сайте ВАК 10 марта 22 года. И все необходимые документы в деле имеются.

**Ефремов Роман Гербертович:** Уважаемые коллеги! Если нет вопросов к представленным материалам, тогда, Андрей Эдуардович, Вам слово. Просьба представить основные результаты и выводы работы. 20 минут регламент.

**Синявин Андрей Эдуардович:** *(Излагает основные положения диссертационной работы.)*

**Ефремов Роман Гербертович:** Спасибо. Вопросы, пожалуйста, коллеги. Да, Сергей Михайлович!

**Деев Сергей Михайлович:** Первый вопрос технический. Фосфолипаза A2, она у Вас рекомбинантная? Или она выделенная только из яда?

**Синявин Андрей Эдуардович:** Она выделена из яда.

**Деев Сергей Михайлович:** Из яда. И тогда уточняющий вопрос. Вы неоднократно говорили, меня интересует фармакологическое окно. То есть, когда проявляется противораковое действие и противовирусное? И когда наступает ТД50? Можете ли Вы сказать о разнице в концентрациях между специфическим анти-вредным действием и токсическим действием на общий организм?

**Синявин Андрей Эдуардович:** Что касается противовирусного действия, то исследуемая фосфолипаза показала 50% цитотоксичность в концентрациях выше 100 микрограммов на

миллилитр. Мы точно не установили, потому что это находится уже ближе к миллиграммовым. А противовирусный эффект она показала на несколько порядков ниже. Это десятки наногаммов. Существенная...

**Деев Сергей Михайлович:** То есть, 100 микрограммов на миллилитр – это на клеточной культуре было показано?

**Синявин Андрей Эдуардович:** Да, это на клеточной культуре.

**Деев Сергей Михайлович:** На организме Вы не делали?

**Синявин Андрей Эдуардович:** На организме – это в дальнейшем планируем изучать.

**Деев Сергей Михайлович:** Спасибо.

**Ефремов Роман Гербертович:** Коллеги, ещё вопросы есть? Александр Габирович, пожалуйста!

**Габиров Александр Габирович:** Андрей Эдуардович, большое спасибо за содержательный доклад. Вот у меня в основном мои вопросы связаны с открытым Вами действием фосфолипазы. Сергей Михайлович уже прояснил в ходе дискуссии с Вами, что это не рекомбинантный фермент, поэтому, конечно, говорить пока о его терапевтическом потенциале рано. Но, наверное, это будущее. Вопрос следующий. Всё-таки фосфолипаза – фермент. Значит, Вы относите её потенциальное терапевтическое действие за счёт активного центра фермента или за счёт белковой глобулы? Как? Дальше я могу спросить действие на ACE2. Там была у Вас конкуренция, показанная в *in vitro*, да? Вот давайте первая группа вопросов. Это Вы связываете гипотетически с активным центром фермента или с белковой глобулой? Если бы у Вас был рекомбинантный фермент, то у меня был бы следующий вопрос. Надо было бы сделать мутант, и этот вопрос сразу же нашёл бы разрешение. Но пока это гипотеза. Вот какая Ваша точка зрения?

**Синявин Андрей Эдуардович:** Дело в том, что у фосфолипазы политаргетный механизм. Первый заключается в именно её фосфолиполитической активности на сам вирус. То есть, она разрушает оболочку вируса за счёт гидролиза мембранных фосфолипидов. А второй механизм, который мы установили, это способность связываться с ACE2 рецептором, что было подтверждено в трёх различных экспериментах. Кроме этого мы также с помощью молекулярного моделирования установили участки взаимодействия. И предполагается, что синтез в дальнейшем набора пептидов, которые могут взаимодействовать с ACE2 или RBD будет также проявлять противовирусный эффект на клетках.

**Габиров Александр Габирович:** Давайте по последней части вопроса. Всё-таки, отвечая на мой вопрос, Вы считаете, что структура... Я Вас не хочу запутать, я просто хочу выяснить, структура фосфолипазы обеспечивает препятствие взаимодействия ACE2 с вирусной частицей?

**Синявин Андрей Эдуардович:** Да.

**Габиров Александр Габирович:** Дальше хотите искать пептид?

**Синявин Андрей Эдуардович:** Это как один из механизмов противовирусного эффекта.

**Габиров Александр Габирович:** Вы считаете, что ферментативная активность здесь ни при чём, а здесь удачно расположение было аминокислот, которые конкурируют с ACE2 за связывание с RBD, да? Мутации.

**Синявин Андрей Эдуардович:** Дело в том, что тут, по всей видимости, общий противовирусный эффект вносит много особенностей.

**Габиров Александр Габирович:** Ну понятно. Я Вам помогаю. Понятно, что Вы его разлагаете, но поскольку мы на молекулярном уровне изучаем, вот то, что Вы пока нам

демонстрируете, это, скорее всего, не активный центр фермента. Я, правда, Вас не сбиваю, а действительно его часть. Потому что он конкурирует. Наверное, так?

**Синявин Андрей Эдуардович:** Да, в принципе.

**Габибов Александр Габибович:** Потому что дальше будете искать пептиды из этой структуры и рассматривать. А какой RBD Вы брали? Омикроновский или классический уханьский? С чем была конкуренция? Там есть разные моменты, и особенно антитела. Вы брали, вот конкуренция с антителами, там же вообще сложная история, потому что антитела, которые... У Вас связывающие антитела, у Вас нейтрализующие, у Вас какие были антитела?

**Синявин Андрей Эдуардович:** Нет. У меня были просто anti-ACE2 антитела коммерческие.

**Габибов Александр Габибович:** Коммерческие.

**Синявин Андрей Эдуардович:** Которые связываются с ACE2.

**Габибов Александр Габибович:** Это не терапевтические антитела?

**Синявин Андрей Эдуардович:** Нет.

**Габибов Александр Габибович:** Ну хорошо, они использовались как такой контроль конкуренции. RBD какой был?

**Синявин Андрей Эдуардович:** RBD был вариант «Ухань».

**Габибов Александр Габибович:** «Ухань». Спасибо!

**Ефремов Роман Гербертович:** Коллеги, пожалуйста! Александр.

**Василевский Александр Александрович:** Спасибо большое. Интересно. И про макрофаги с ацетилхолиновым рецептором, и про фосфолипазу. Если позволите, я хотел бы уточнить. Ваше исследование – что нового, если по-простому? Что нового привнесли в обе эти области? Если я правильно понимаю, то макрофаги пэтчили и там регистрировали  $\alpha 7$  раньше. А секретируемые фосфолипазы с противовирусным эффектом Anti-HIV – это 90-е годы ещё. Могли бы высветить, вот Ваши результаты – они новое вот это показывают. Было бы здорово. Спасибо.

**Синявин Андрей Эдуардович:** Что касается первой части работы, то первое, что хотелось бы сказать, это то, что исследована с разных сторон именно функциональная активность  $\alpha 7$ -рецепторов на макрофагах. В предыдущих исследованиях ни в одном из исследований не удалось показать его именно ионотропную активность. И предполагалось, что он действует по метаботропному пути. Второй момент. Обычно  $\alpha 7$ -рецептор исследовался в контексте именно только воспаления. Это блокирование продукции фактора некроза опухоли. Мы решили его изучить ещё и с другой стороны. То есть, есть у нас сепсис, а есть фаза, следующая за сепсисом, это иммуносупрессивная. И считается, что именно эта фаза может привести к гибели человека. И мы решили изучить с другой стороны, не только в контексте воспаления, но и следующей фазы, которая следует за сепсисом. Естественно, мы впервые обнаружили регуляцию экспрессии макрофагальных мембранных белков на макрофагах, показали влияние на продукцию именно цитокинов именно уже с использованием селективного агониста, а не неселективных лигандов, таких как никотин или ацетилхолин. Что касается второй части работы по фосфолипазам, касательно анти-ВИЧ эффекта действительно есть статья 90-го года по анти-ВИЧ эффекту. Там в большей степени анализировался эффект пчелиных фосфолипаз. И мы также, когда публиковали статью, сравнивали данные. У нас совершенно получались противоположные результаты по противовирусному действию механизмам от того, что была исследована касательно этой змеиной фосфолипазы. Кроме этого мы более подробно изучили механизмы анти-

ВИЧ эффекта. И впервые изучили активность фосфолипаз против SARS-CoV-2 тоже с установлением их каких-то механизмов противовирусного эффекта.

**Ефремов Роман Гербертович:** Коллеги, ещё есть вопросы? Если нет, я позволю себе задать тоже 2 вопроса. Вы изучали 2 сильно отличающихся по структуре и по функции белка -  $\alpha$ -Нейротоксин и фосфолипаза A2. А что их объединяет в Вашей работе? В итоге всех проведённых экспериментов, Вы много показывали результатов по измерениям активности и так далее. Вы как-то можете эти два объекта свести к какой-то единой концепции их действия на мишень или роль никотинового ацетилхолинового рецептора. Вот как объединить эти две части работы?

**Синявин Андрей Эдуардович:**  $\alpha$ -Нейротоксины, в работе использовался, в частности,  $\alpha$ -бунгаротоксин, вторая часть – это фосфолипазы. Они послужили инструментом или объектом данного исследования.  $\alpha$ -Нейротоксин для идентификации рецепторов, вовлечённых в воспалительный процесс. С другой стороны, фосфолипаза A2 также участвует в воспалительном процессе. И способны связываться тоже с никотиновыми рецепторами, то есть, являются их лигандами. Кроме этого это два компонента, которые содержатся в яде. И поэтому эти моменты могут, несомненно, объединять.

**Ефремов Роман Гербертович:** Понятно. И второй вопрос связан с предыдущими вопросами коллег. Со структурной точки зрения, потому что Вы показали данные молекулярного моделирования, но не очень понятно, как, допустим, та же фосфолипаза, учитывая, что это белок, который связывается с мембраной, как она может действовать со структурной точки зрения с учётом взаимодействия с мембраной, роль мембраны, как RBD домен в SARS-CoV-2 или ACE2 рецептор. Вот как она их достигает? У Вас есть какие-то положения на этот счёт?

**Синявин Андрей Эдуардович:** Что касается этого вопроса, то, конечно, одним из основных механизмов является фосфолиполитическая активность, то есть, разрушение оболочки вируса. Кроме того мы ещё также дополнительно показали, что арахидоновая кислота, которая является продуктом гидролиза, также проявляет и противовирусный эффект. То есть, может опосредоваться при гидролизе мембранных фосфолипидов какой-то механизм уже внутриклеточный и влиять на другие стадии репликации. С другой стороны, вот ферментативная активная субъединица, входящая в состав димерной, показала способность связываться с ACE2 рецептором. То есть, заблокировать его, и за счёт этого вирус не может полноценно, или частично только прикрепляется к клетке и дальше уже проникает. С помощью моделирования и выравнивания мы только показали участки, через которые идёт взаимодействие с RBD или с ACE2 рецептором.

**Ефремов Роман Гербертович:** Токинг какой-то белковый делали? Или как эти взаимодействия оценивали? Структуры же, насколько я понимаю, нет комплексов фосфолипаз?

**Синявин Андрей Эдуардович:** Да, мы взяли структурно близкую фосфолипазу и сделали токинг взаимодействий.

**Ефремов Роман Гербертович:** Насколько надёжны результаты? Белковый токинг в отсутствии надёжного шаблона Вам даст очень много решений. Тут очень важно их как-то откластеризовать и выбрать наиболее вероятные и оценить разные решения. Тут как с этой точки зрения?

**Синявин Андрей Эдуардович:** Мы в будущем уже планируем провести более детальные моделирования, подбор различных пептидов, которые можно синтезировать, проверить их на противовирусную активность. Здесь в работе, в целом, описаны механизмы и первичные, так скажем, данные касательно моделирования. Мы ещё дополнительно делали

выравнивание, смотрели гомологию. Конечно, в дальнейшем планируется более чётко и детально провести эти исследования.

**Ефремов Роман Гербертович:** Понятно. Коллеги, если больше вопросов нет, тогда переходим к обсуждению. Слово предоставляется Виктору Ионовичу Цетлину, научному руководителю соискателя.

**Цетлин Виктор Ионович:** Насколько я понимаю, я должен охарактеризовывать только диссертанта, не касаясь его работы.

**Ефремов Роман Гербертович:** Нет, а то Вы нам лекцию сейчас прочитаете. Мы Вас знаем.

**Цетлин Виктор Ионович:** Мне приятно, что к нам пришёл, сделав дипломную работу в Институте Гамалеи, имеет публикации по ВИЧ. И основная моя надежда была, в литературе были данные, что ВИЧ сопровождается воспалительными процессами, сопровождается взаимодействием с никотиновыми рецепторами, может, это будет одна из линий. Но, может быть, она не совсем получилась. Но я рад, что нам удалось объединить уже те исследования, которые мы много лет проводили, мы много знаем о змеиных ядах. То, что Вы спросили, а что общее между тем и другим, и начать какие-то новые направления. Я не буду больше говорить об этой работе, это оказался человек, идеально к этому готовый. И нам повезло, что он пришёл уже с публикацией. Он пришёл с опытом работы в Гамалеи. И пока мы поначалу первые два года занимались в нашем институте исключительно с процессами макрофагальными и так далее, а когда появился COVID, оказалось, что очень полезно, когда твой аспирант работает в таком серьёзном институте и независимо делает работы, является соавтором Гинцбурга, скажем так. И я рад, что нам это удалось объяснить. Отчасти, на Ваш вопрос, что общего – токсины и так далее. Он уже отметил, что с помощью ушедшей пару лет назад Кати Вульфис в Пушино, мы открыли, что фосфолипаза взаимодействует с никотиновыми рецепторами. По крайней мере, в рамках этой диссертационной работы ... Я хочу сказать, что я рад, что он у нас работает, что он у нас будет работать. И я думаю, что он повторит судьбу других аспирантов нашего отдела, которые сейчас стали заведующими лабораторий. Это парень действительно замечательный. Спасибо.

**Ефремов Роман Гербертович:** А обратно он не уйдёт в Гамалеи?

**Цетлин Виктор Ионович:** Это вопрос задаётся не мне. Я никуда не уйду из ИБХ.

**Ефремов Роман Гербертович:** Нет, я говорю про соискателя. Это шутка. Спасибо, Виктор Ионович. К научному руководителю вопросов, по-видимому, нет. Следующий пункт обсуждения. Заключение организации, где выполнялась работа. ИБХ РАН.

**Олейников Владимир Александрович:** *(излагает заключение организации, где выполнялась диссертация).* Уже было сказано, что работа выполнена в нашем институте. У меня в руках заключение от нашего института. Опять же, биографические данные, о которых мы уже говорили сегодня. Тема диссертации утверждена в нашем институте на учёном совете в 17-м ещё году, а в окончательной редакции в 21-м. Было обсуждение, соответственно, на семинаре. По итогам обсуждения принято следующее заключение. Что работа, изложенная в его диссертации, посвящена актуальной проблеме современной науки исследования потенциальной роли  $\alpha 7$  никотиновых ацетилхолиновых рецепторов. И основные результаты, полученные автором, исследована функциональная экспрессия этого рецептора на клетках макрофагах человека. И далее достаточно подробно изложено то, что мы сегодня уже слышали. Пишется здесь, что работа, результаты обладают научной новизной, имеют теоретическое и практическое значение. Им впервые установлено, что человеческие макрофаги экспрессируют функциональные ионотропные  $\alpha 7$  вот эти рецепторы. Впервые продемонстрировано, что активация данных рецепторов приводит к

регуляции ряда мембранных макрофагальных белков, перечислены некоторые белки. Установил Синявин механизмы действия змеиной ФЛА2 по отношению к раковым клеткам, которое заключалось в ингибировании маркера пролиферации и индуцированному апоптозу, некрозу. Опять же, впервые обнаружен противовирусный эффект. И так далее. Тут целая серия разных интересных вещей со словом «впервые». И результаты работы, несомненно, представляют не только фундаментальную, но и интересную практическую ценность для разработки новых иммуномодулирующих и противовирусных средств, выполнена на высоком экспериментальном уровне. И как заключение, что эта работа рекомендована к защите по специальности «Биоорганическая химия» 1.4.9. И это было принято на заседании отдела молекулярной нейроиммунной сигнализации. Подписано доктором химических наук, вот этот протокол, Кашеверовым Игорем Евгеньевичем. Естественно, Ямпольский Илья Викторович. И заключение утверждено директором нашего института академиком Александром Габибовичем Габибовым. Это что касается заключения.

*(Излагает отзыв ведущей организации. Отзыв положительный).* Теперь отзыв ведущей организации на диссертационную работу Синявина Андрея Эдуардовича. Начинается отзыв с того, что подчёркивается актуальность работы. Тут немножко необычно. Сразу говорится о структуре, что изложена на 181 странице, 41 рисунок, 285 источников. Работа построена по стандартному принципу. Введение, обзор литературы, описание материалов. По теме диссертации опубликовано 10 работ, в том числе, 7 статей в рецензируемых научных журналах.

Подчёркивается актуальность проблемы, она отражена и описывается, подчёркивается. Значение диссертационной работы идёт как отдельный раздел. И задачи, которые ставятся в этой работе – то, что мы уже сегодня слышали. Результаты диссертационной работы имеют несомненную научную новизну. Впервые показано, что макрофаги человека экспрессируют функциональный рецептор  $\alpha 7$  рецептор вот этот. И тут впервые выявлена противовирусная активность димерных фосфолипидов А2, выделенных из яда гадюки Никольского против SARS-CoV-2 – это возбудитель COVID-19, также различных субтипов ВИЧ. Кроме того, предложен механизм ингибирующего действия данных ферментов в отношении SARS-CoV-2.

Научные результаты соответствуют цели исследования и его задачам. Содержание автореферата соответствует. Содержание опубликованных работ соответствует содержанию диссертации. Достоверность и обоснованность несомненна. Выводы соответствуют поставленным задачам.

И вот здесь, наконец, пункт «замечания и вопросы по диссертации Синявина».

Есть следующие замечания. Тут несколько замечаний, которые я зачитаю.

Во-первых, некорректным является написание в задачах работы «экспрессии профиля мембранных маркеров». Корректнее употреблять термин «профиль экспрессии маркеров».

Второе. При оценке противоопухолевой активности *in vitro* целесообразно рассчитывать 50% токсическую концентрацию для проведения численной оценки активности и возможности сравнения тестируемых препаратов между собой.

Третье. При оценке противовирусной активности *in vitro* целесообразно рассчитывать индекс селективности для оценки соотношения между токсичностью и активностью исследуемых препаратов.

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



На этом замечания и вопросы кончаются. Дальше идёт заключение, где показано и декларируется, что эта работа по своей актуальности, научной новизне, значимости, объёму выполненных исследований соответствует уровню диссертационных работ. Работа сама соответствует «Положению ВАКа о присуждении соответствующих степеней», а сам Синявин 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 референс-центром ВОЗ по надзору за полиомиелитом Центра имени Чумакова РАН, и это кандидат биологических наук Козловская. И, соответственно, отзыв ведущей организации, я не сказал вначале, что ведущей организацией является Федеральный научный центр исследований в разработке иммунобиологических препаратов РАН, то есть Институт полиомиелита. А подписал отзыв, утвердил директор, член-корреспондент РАН, профессор, доктор медицинских наук Ишмухаметов. Но были замечания.

**Ефремов Роман Гербертович:** Спасибо. Андрей Эдуардович, пожалуйста, вопросы, замечания, ответьте, пожалуйста.

**Синявин Андрей Эдуардович:** Я соглашусь с замечаниями. Но, опять же, я говорил про это, что касается установления 50% цитотоксических концентраций перед, допустим, изучением противовирусного эффекта, они находились в диапазоне более 100 микрограммов на миллилитр. И в таком случае целесообразно использовать, указывать то, что данная концентрация выше 100 микрограммов на миллилитр. Во всяком случае, во многих исследованиях такое допускается. Что касается вопроса масс-спектрометрии, то это не разные компоненты, а активная фракция характеризовалась однозарядными и двухзарядными ионами. На самом деле это не два разных каких-то компонента, а один и тот же с  $m/z$  13000 как здесь, так и здесь. Это один и тот же компонент.

**Ефремов Роман Гербертович:** Спасибо. Уважаемые коллеги, других отзывов на работу и на автореферат не будет, не поступило, поэтому мы переходим к заслушиванию отзывов официальных оппонентов. Готтих Марина Борисовна, пожалуйста, Вам слово.

**Готтих Марина Борисовна:** *(излагает отзыв, отзыв положительный)*. Уважаемый председатель, члены диссертационного совета, коллеги! Я с удовольствием прочитала диссертацию. Мне было интересно. Поскольку мы тут уже все очень давно сидим, я буду максимально коротко говорить и в основном о том, что было мне действительно наиболее интересно. И то, что вызвало у меня какие-то вопросы. Из формальных вещей только скажу, что, естественно, в диссертации есть обзор литературы, который, так же как и вся работа, состоит из двух частей. Одна часть посвящена рецептору, вторая фосфолипазам. И обзор хорошо написан, там почти нет грамматических ошибок и всяких описок и несостыковок. И тоже я его с удовольствием прочитала. Он лучше помогает понять, что же в конечном итоге сделал диссертант. То, что работа актуальна, что получены новые результаты, это сегодня уже звучало из отзыва ведущей организации, не буду это повторять. Действительно получены новые интересные результаты. Та часть, которая касается  $\alpha 7$ -рецептора, у меня не вызвала вообще никаких вопросов. Я считаю, что она очень хорошо сделана. Там действительно получены интересные результаты, новые результаты. И о них, если позволите, я говорить не буду. Вы слышали хороший доклад. Диссертант хорошо отвечал на вопросы. Действительно хорошо сделанная работа. Буду говорить в основном о второй части по поводу фосфолипаз.

Надо сказать, что когда я взяла в руки эту диссертацию и увидела, что там решили изучать действие фосфолипаз на клетки и на вирусы, как-то я слегка напряглась. Фосфолипаза – она и есть фосфолипаза. Клеточная оболочка состоит из фосфолипидов. Вирусная оболочка, естественно, тоже состоит из фосфолипидов. Фосфолипаза разрушит оболочку, и что тут может быть интересного? Оказалось, что интересное есть. И, на мой

взгляд, наиболее интересно то, что по данным диссертанта фосфолипазы из змеиного яда обладают неким действием, например, на клетки раковые и не обладают вообще никаким цитотоксическим действием на нераковые. Для меня это некое открытие, если хотите, и большая загадка. Нет цитотоксического эффекта на нормальные клетки. И когда изучалось действие на раковые клетки фосфолипаз, и когда изучалось противовирусное действие. Честно говоря, я не понимаю, почему нет действия на нормальные клетки. Тем не менее, первая часть работы по фосфолипазам – это изучение цитотоксического действия на две линии раковых клеток. И показано, что есть цитотоксическое действие. Показано, что останавливается, снижается степень экспрессии определённого фактора, который отвечает как раз, пролиферативного фактора. И увеличивается количество апоптотических клеток. И дальше, как раз исходя из того, что есть цитотоксическое действие на раковой линии, и нет цитотоксического действия на нераковой линии, диссертант делает вывод, что, очевидно, это цитотоксическое действие на раковой линии не связано с ферментативной активностью фосфолипаз. Предположение интересное. Но оно высказано, и никак не подтверждено. И это моё первое замечание, если хотите, к работе. Это крайне интересно, и хотелось бы иметь некое подтверждение, некое продолжение. И очень жалко, что диссертант остановился вот здесь. Это моё первое замечание.

Дальше что касается противовирусного эффекта. Действие на ВИЧ, опять-таки, там разное, такое мультиплексное действие. Но, так или иначе, на мой взгляд, оно всё связано с воздействием в основном на вирусную мембрану. Нарушение вирусной мембраны. И в подтверждение этого говорит то, что на разные штаммы, на разные подвиды вируса действие немножко отличается. Скорее всего, оно как раз отличается именно потому, что у разных штаммов немножко разные в первую очередь белковые составляющие. Белок оболочки различается. Здесь тоже больших вопросов у меня нет.

А вот вопросы относительно SARS-CoV-2. Андрей Эдуардович показал, что под действием фосфолипазы происходит разрушение вирусной оболочки, меняется морфология вируса. Второе важно, что блокируются рецепторы, по которым вирус проникает в клетку. Это очень интересно. Но когда он попытался посмотреть, на какой этап вирусного цикла действует фосфолипаза, он показал, что на этап проникновения, связывания и проникновения вируса в клетку действие есть, но это всего 40% от всего противовирусного действия. А вот когда фосфолипаза добавляется к клеткам, когда вирус в них уже проник, противовирусное действие такое же, как если тотально просто посмотреть, налить то и другое, и будет тотальное действие. И здесь действие аналогичное тотальному. Получается, что основная мишень для фосфолипазы внутри клетки. А этот момент дальше в работе совсем не исследован. Это моё второе замечание. И это тоже, на мой взгляд, очень жаль.

Но, тем не менее, работа сделана большая. Работа сделана интересная. Я не буду зачитывать формальные вещи, по всем формальным показателям работа достойна того, чтобы её считать кандидатской диссертацией. А Андрей Эдуардович, несомненно, достоин того, чтобы сделать его кандидатом химических наук. Спасибо.

**Ефремов Роман Гербертович:** Спасибо, Марина Борисовна. Андрей Эдуардович, ответьте, пожалуйста, на замечания.

**Синявин Андрей Эдуардович:** Спасибо за вопросы и замечания. Что касается первого вопроса, почему фосфолипаза действует на раковые клетки, не действует на нормальные клетки. Полностью исключить именно то, что фосфолипаза проявляет свой эффект за счёт гидролиза фосфолипидов именно на онкоклетках, этого исключить нельзя. Поскольку известно, что онкотрансформация запускает ряд процессов, в том числе, и существенное изменение липидного метаболизма. И, по всей видимости, за счёт преобладания тех или иных фосфолипидов именно в онкоклетках происходит более селективная термобилизация мембраны с помощью данной фосфолипазы. При этом в дальнейшем, и это даже описано для некоторых фосфолипаз, запускается ряд процессов, которые приводят к

высвобождению активных форм кислорода, активации каспазы 3, различных апоптотических белков, что и вызывает гибель клетки. Это касательно первого вопроса. Второй вопрос касательно post-entry. Действительно мы получили данные, что добавление фосфолипазы, когда клетка уже заражена вирусом, приводит к практически 100% ингибированию. Мы также провели дополнительные эксперименты с использованием как инфекционного вируса, так и псевдовируса, где обнаружили, что фосфолипаза обладает практически аналогичным действием, на стадиях post-entry активно ингибирует репликацию. Схожие результаты я находил в одной из предыдущих работ, где исследовалось противовирусное действие против гепатита С. Так вот, показано, что обработка инфицированных клеток гепатитом С с помощью фосфолипазы приводит к блокированию продукции пятого неструктурного белка. Предполагается, что фосфолипаза может также вмешиваться и в липидный метаболизм клетки, что приводит к остановке репликации вируса. Кроме того, имеются данные, что фрагменты различных токсинов проявляют активность не только на стадиях entry, но и могут быть ингибиторами протеаз вирусных. Поэтому, конечно, этот механизм интересный, его ещё предстоит изучить.

**Ефремов Роман Гербертович:** Спасибо. Марина Борисовна, Вы удовлетворены ответом?

**Готтих Марина Борисовна:** Да, удовлетворена.

**Ефремов Роман Гербертович:** Спасибо. Второй официальный оппонент Сергей Викторович Костров отсутствует, он в командировке. Владимир Александрович, основные положения отзыва.

**Олейников Владимир Александрович:** *(излагает отзыв оппонента Кострова С.В., отзыв положительный).* Да, у меня в руках отзыв. Отзыв полностью положительный. Опять же, актуальность, структура и объём, основные результаты, которые мы сегодня слышали уже, получили удовольствие от доклада. Я сразу перейду к замечаниям. Там всё положительно, и, естественно, всё очень здорово. Замечания и вопросы к работе. Первое. В диссертационной работе подробно изучена функциональная активность  $\alpha 7$  рецептора макрофагов человека. Показана экспрессия данного рецептора на транскрипционном и трансляционном уровнях, подтверждена его активность как ионного канала, а также изучено влияние его активации на экспрессию ряда ключевых мембранных белков и цитокинов, участвующих в воспалительных процессах в межклеточном взаимодействии. Однако в работе также показано присутствие транскриптов нескольких других нейрональных субъединиц рецептора  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ , бета3, бета4 со сходными с  $\alpha 7$  уровнями экспрессии. К тому же наблюдались клеточные кальциевые ответы макрофагов при добавлении неселективных агонистов рецептора. Оценивался ли в работе вклад гетеромерных ацетилхолиновых рецепторов в изучаемые реакции макрофагов? Или это планируется проводить в последующих исследованиях?

Второе. Данные, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, доказывают функционирование  $\alpha 7$ -рецептора макрофагов человека как классического ионотропного рецептора. Однако в литературе имеются убедительные указания и его метаболитного участия в ряде сигнальных каскадов в иммунных клетках. Может ли автор более подробно остановиться на данной проблеме, так как в диссертации она обсуждена недостаточно полно?

Третье. При исследовании функциональной активности  $\alpha 7$ -рецептора макрофагов человека использовались его селективные лиганды: агонист PNU там цифры и позитивный модулятор PNU120596. Однако в работе по исследованию влияния агонистов рецептора на функциональную активность P2X7 рецепторов в макрофагах в тучных клетках применялись только холинергические агонисты широкого спектра действия (ацетилхолин и никотин). Но при этом не наблюдалось ожидаемого перекрёстного эффекта холинергической и пуринергической рецепторных систем. Проводились ли аналогичные

опыты под действием более селективных или более эффективных агонистов холинорецепторов?

Четвёртое. Исследования цитотоксического действия ФЛА2 из яда крайта проводилось в отношении ряда раковых клеточных линий клеток рака молочной железы человека, перечислены три линии клеток. Клеток карциномы лёгкого (A 549) и клеток рака предстательной железы человека (PC-3 и LNCaP). Интересно, что из всех клеточных линий изучаемая ФЛА2 не оказала цитотоксического влияния на доброкачественные эпителиальные клетки почки человека. Чем объясняется такое различие в цитотоксическом действии данной фосфолипазы?

Далее идёт заключение, в котором всё сказано, что перечисленные замечания не умаляют достоинства, что диссертация соответствует всем положениям, а сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – «Биоорганическая химия». Официальный оппонент – директор Федерального государственного бюджетного учреждения Институт молекулярной генетики национального исследовательского центра «Курчатовский институт» Сергей Викторович Костров, доктор химических наук, член-корреспондент Российской академии наук.

**Ефремов Роман Гербертович:** Спасибо, Владимир Александрович. Андрей Эдуардович, пожалуйста, ответьте на вопросы оппонента.

**Синявин Андрей Эдуардович:** По первому вопросу, что в макрофагах были обнаружены транскрипты некоторых нейрональных субъединиц – это действительно со сходными уровнями экспрессии. Наблюдалось однако, и также были ответы как на эпибатидин, так и никотин. Но при этом что здесь важно подчеркнуть? Что ответы на никотин, например, в равной степени блокировались как  $\alpha$ -бунгаротоксином, так и селективным антагонистом  $\alpha 7$ -рецепторов, но не антагонистом гетеромерных рецепторов. Кроме этого, что указывает на то, что  $\alpha 7$ -рецептор является доминирующим подтипом, экспрессированным данными клетками.

Однако, здесь ещё спрашивается про вклад гетеромерных рецепторов, и планируется ли проводить в последующих исследованиях. Действительно данная работа послужила как отправной точкой для более глубоких исследований. На данный момент мы действительно изучаем вклад именно гетеромерных рецепторов в воспалительные процессы, в продукцию цитокинов. А эта работа в большей части была посвящена исследованию роли именно  $\alpha 7$ -типа рецепторов.

Второй вопрос про ионотропную активность. Я уже отвечал на этот вопрос, что действительно в предыдущих работах с использованием иммунных клеток не удалось зафиксировать токи, которые свидетельствовали бы о том, что  $\alpha 7$ -рецепторы функционируют как ионные каналы. Нам удалось показать обратное. И именно с использованием селективного агониста  $\alpha 7$ -рецепторов, а также в комплексе с позитивно аллостерическим модулятором, что говорит о том, что все последующие внутриклеточные каскады идут не за счёт метаботропной активности и участия каких-либо ещё вторичных посредников, а именно за счёт ионотропной активности через  $\alpha 7$  опосредованные канальцевые потоки в клетке.

Что касается P2X7-рецепторов, почему мы использовали именно ацетилхолин и никотин. Дело в том, что в предыдущей работе, в которой показано, что обработка клеток с помощью данных лигандов приводит к блокированию высвобождения интерлейкин-1-бета. Предполагается, что в данный процесс в большей степени вовлечены  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$  рецепторы. Поэтому чтобы максимально приблизиться к тем же условиям, мы использовали именно эти лиганды, а не селективные агонисты  $\alpha 7$ -рецепторов.

И последний вопрос касательно цитотоксичности фосфолипазы в отношении нормальных раковых клеток - в предыдущем ответе уже говорил, освещал.

**Ефремов Роман Гербертович:** Спасибо. Ответы получены. Уважаемые коллеги, открываем открытую дискуссию по результатам работы. Сергей Михайлович, пожалуйста.

**Деев Сергей Михайлович:** Дорогие коллеги! Когда я увидел, что у нас будет такая защита, я посмотрел материалы, потому что меня интересуют всякие новые соединения, которые будут использоваться в сочетанной терапии рака, или новый взгляд на старые соединения. Поэтому я ознакомился до сегодняшнего дня с материалами. И на меня очень хорошее впечатление произвела тщательность подготовки материала. На графиках отложены все доверительные интервалы. Вот классическая, у нас прекрасный отдел, прекрасная лаборатория. Это очередная классическая высококачественная работа из нашего прекрасного отдела, которым руководит Виктор Ионович и профессор Уткин.

Теперь по сути работы. Значит, это по качеству. Когда присутствуешь уже не на первой сотне диссертаций на защитных советах, видишь непростую роль человека, который выходит на какие-то практически всех волнующие вещи. В данном случае упоминалась противораковая активность, противовирусная активность. Когда мы присутствуем на защите просто по молекулярной биологии, где открыт новый фермент, изучены какие-то графики, показаны какие-то функции, ну обычно интересно, 1-2 вопроса. И всё, люди как-то удовлетворяются. И вот, с одной стороны, выгодная, с другой стороны, очень опасная ситуация, когда человек позиционирует какие-то практические применения. Что мы увидели, начиная с моего вопроса, и кончая выступлением Марины Борисовны Готтих, где был целый ряд вопросов, которые возникают. И вот это здорово. Тем более, что вот я был на одной встрече с ректорами, сейчас будут пересматриваться, очередная идёт у нас в министерстве оценка научной деятельности. Будут не так ценны статьи высокорейтинговые, как практическое применение. И вот эта работа, мне кажется, имеет интересный потенциал, её действительно дальнейшего применения. И уже давно работаем, буду заканчивать тем, что мне очень всё понравилось, прекрасные ответы на вопросы. Прекрасно выполненная работа. А то, что возникает столько вопросов, это говорит, что работа интересная. И пожелаем успехов диссертанту в дальнейших. Я буду однозначно голосовать за. Призываю всех сделать то же самое.

**Ефремов Роман Гербертович:** Спасибо, Сергей Михайлович. Ещё есть желающие выступить? Уже много тут сказано хороших слов. Спасибо. Тогда объявляется перерыв на голосование. Состав счётной комиссии уже был объявлен.

**Реплики:** Последнее слово.

**Ефремов Роман Гербертович:** Да, извините. Не последнее слово, а заключительное слово. Предыдущий соискатель просто, предвидя вот такую мою ошибку, он сразу выступил с заключительным словом. Пожалуйста, Андрей Эдуардович.

**Синявин Андрей Эдуардович:** Я хочу поблагодарить всех за вопросы, за замечания ценные. Также хочу поблагодарить научного руководителя Виктора Ионовича за помощь, ценные советы на протяжении всей работы. Юрия Николаевича Уткина, без которого не могла бы быть вторая часть этой работы. Своих официальных оппонентов. Марину Борисовну Готтих за проявленный интерес и возможность дать объективную оценку данной работе. Конечно же, всем сотрудникам нашего отдела. И также есть коллеги из Центра Гамалеи, в лаборатории которого выполнялись мною исследования с использованием инфекционных вирусов. Также хочу поблагодарить за моральную поддержку и помощь. Всё, спасибо большое.

**Ефремов Роман Гербертович:** Спасибо. Теперь мы можем приступить к голосованию. Состав счётной комиссии был объявлен. Во время подсчёта голосов, коллеги, члены диссертационного совета, предлагается обсудить заключение (*проходит обсуждение проекта заключения*)

*(Проходит тайное голосование)*

