

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,

созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 15 июня 2022 г. № 14

О присуждении **Синявину Андрею Эдуардовичу**, гражданину РФ, ученой степени кандидата химических наук.

Диссертация **« α -Нейротоксины и фосфолипазы A2 змеиных ядов в исследовании процессов репродукции вирусов и патогенеза воспаления»** по специальности 1.4.9 – Биоорганическая химия принята к защите 2 марта 2022 г., протокол №6 диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (адрес 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10) и действующим на основании Приказов Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г. и № 561 от 03.06.2021.

Соискатель, Синявин Андрей Эдуардович 1993 г. рождения, в 2021 г. окончил аспирантуру ИБХ РАН, работает младшим научным сотрудником и выполнил диссертацию в отделе молекулярной нейроиммунной сигнализации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Научный руководитель – д.х.н., чл.-корр. РАН Цетлин Виктор Ионович, заведующий Отделом молекулярной нейроиммунной сигнализации ИБХ РАН.

Официальные оппоненты:

Костров Сергей Викторович – доктор химических наук, член-корреспондент РАН, профессор, директор Федерального государственного бюджетного учреждения Институт молекулярной генетики НИЦ "Курчатовский институт";

Готтих Марина Борисовна – доктор химических наук, профессор, заведующая отделом Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова
дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), г. Москва, в своем *положительном* заключении, подготовленном к.б.н. Козловской Любовью Игоревной, ведущим научным сотрудником лаборатории полиомиелита и других энтеровирусных инфекций с референс-центром ВОЗ по надзору за полиомиелитом, и утвержденном генеральным директором, д.м.н., академиком РАН, проф. Ишмухаметовым Айдаром Айратовичем, указала, что диссертация является законченным научно-квалификационным исследованием, вносит значительный вклад в изучении фундаментальной проблемы – функциональной роли $\alpha 7$ никотинового

ацетилхолинового рецептора в процессе воспаления, а также расширяют химическое пространство противоопухолевых и противовирусных соединений, и соответствует всем требованиям «Положения о присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями, внесенными Постановлениями Правительства РФ от от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 26.05.2020 № 751, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а сам диссертант заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9. – Биоорганическая химия.

Соискатель имеет 10 опубликованных работ по теме диссертации, из них – 7 статей общим объемом 6 печ.л в рецензируемых зарубежных научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций, и 3 тезиса докладов в сборниках материалов международных конференций, на которых докладывались результаты диссертационной работы. Во всех опубликованных работах соискатель принимал активное участие на стадии экспериментальной работы, обсуждения полученных результатов, подготовки статей к печати. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных работах. Наиболее значимые рецензируемые научные работы по теме диссертации, в которые автор внес основной либо существенный вклад и является первым автором:

1. **Andrei Siniavin**, Svetlana Grinkina, Alexey Osipov, Vladislav Starkov, Victor Tsetlin, Yuri Utkin. Anti-HIV Activity of Snake Venom Phospholipase A2s: Updates for New Enzymes and Different Virus Strains. *Int J Mol Sci.* 2022. 22(3), 1610. doi.org/10.3390/ijms23031610.
2. **Andrei E. Siniavin***, Maria A. Streltsova, Maria A. Nikiforova, Denis S. Kudryavtsev, Svetlana D. Grinkina, Vladimir A. Gushchin, Vladislav G. Starkov, Alexey V. Osipov, Sarah C. R. Lummis, Victor I. Tsetlin and Yuri N. Utkin*. Snake venom phospholipase A2s exhibit strong virucidal activity against SARS-CoV-2 and inhibit the viral spike glycoprotein interaction with ACE2. *Cell. Mol. Life Sci.* 2021. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03985-6>.
3. Dilyara Nurkhametova*, **Andrei Siniavin***, Maria Streltsova, Denis Kudryavtsev, Igor Kudryavtsev, Raisa Giniatullina, Victor Tsetlin, Tarja Malm and Rashid Giniatullin. Does Cholinergic Stimulation Affect the P2X7 Receptor-Mediated Dye Uptake in Mast cells and Macrophages? *Front. Cell. Neurosci.* 2020. 14: 548376. doi.org/10.3389/fncel.2020.548376. (* - равный вклад авторов)
4. **Andrei E Siniavin***, Maria A Streltsova, Denis S Kudryavtsev, Irina V Shelukhina, Yuri N Utkin, Victor I Tsetlin. Activation of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Upregulates HLA-DR and Macrophage Receptors: Potential Role in Adaptive Immunity and in Preventing Immunosuppression. *Biomolecules.* 2020. 10(4): 507. doi: 10.3390/biom10040507.

На диссертацию поступили отзывы:

1. **Отзыв официального оппонента чл.-корр. РАН Кострова С.В.** Отзыв положительный, содержит следующие замечания: 1) В диссертационной работе подробно изучена функциональная активность альфа 7 nAChR 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 и межклеточных взаимодействиях. Однако в работе также показано присутствие транскриптов нескольких других нейрональных субъединиц nAChR ($\alpha 2$, $\alpha 4$, $\beta 3$, $\beta 4$) со сходными с альфа 7 nAChR уровнями экспрессии, к тому же наблюдались клеточные кальциевые ответы макрофагов при добавлении неселективных агонистов nAChR. Оценивался ли в работе вклад гетеромерных nAChR в изучаемые реакции макрофагов или это планируется проводить в последующих исследованиях? 2) Данные, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, доказывают функционирование альфа 7 nAChR макрофагов человека как классического ионотропного рецептора. Однако в литературе имеются убедительные указания и его метаботропного участия в ряде сигнальных каскадов в иммунных клетках. Может ли автор более подробно остановиться на данной проблеме, т.к. в диссертации она обсуждена недостаточно полно. 3) При исследовании функциональной активности альфа 7 nAChR макрофагов человека использовались его селективные лиганды: агонист PNU282987 и позитивный модулятор PNU120596. Однако в работе по исследованию влияния агонистов nAChR на функциональную активность P2X7 рецепторов в макрофагах и тучных клетках применялись только холинергические агонисты широкого спектра действия (ацетилхолин и никотин), но при этом не наблюдалось ожидаемого перекрестного эффекта холинергической и пуринергической рецепторных систем. Проводились ли аналогичные опыты под действием более селективных или более эффективных агонистов холинорецепторов? 4) Исследования цитотоксического действия ФЛА2 из яда крайта *Bungarus fasciatus* проводились в отношении ряда раковых клеточных линий: клеток рака молочной железы человека (MCF-7, BT-474 и SK-BR-3), клеток карциномы легкого (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 НК2. Чем объясняется такое различие в цитотоксическом действии данной фосфолипазы?.

2. Отзыв официального оппонента проф. Готтих М.Б. Отзыв положительный, содержит следующие замечания: 1) В первую очередь, хотелось бы отметить исследование цитотоксического действия ФЛА2 из яда крайта *B. fasciatus* в отношении раковых клеток. В работе указано, что исследуемая ФЛА2 проявляла цитотоксичность в отношении ряда раковых клеток, но не влияла на нераковые клетки НК2. Это позволило диссертанту предположить, что цитотоксичность не связана напрямую с ферментативной активностью. Однако, к сожалению, это интересное предположение не проверено с использованием инактивированной ФЛА2 и никаких гипотез о возможном механизме действия ФЛА2 также не сделано; 2) Второй вопрос касается исследования механизма ингибирования репликации SARS-CoV-2. В работе указывается, что антивирусное действие ФЛА2 HDP-2 может обеспечиваться за счет гидролиза липидов в мембране вируса, а также за счет ингибирования связывания вирусного гликопротеина S с

клеточным белком ACE2. Однако, при выяснении стадии цикла репликации SARS-CoV-2, на которые действуют ФЛА2, Синявиным А.Э. было установлено, что стадия связывания вируса с клеткой и проникновения ингибируется достаточно слабо: всего 40% от тотального антивирусного эффекта. В то же время, если ФЛА2 добавлялась к клеткам через час после их инфицирования, т.е. уже после проникновения вируса, наблюдалось такое же эффективное ингибирование, как и при инфицировании уже обработанных ФЛА2 клеток. Из этого следует, что основное ингибирующее действие ФЛА2 направлено на какую-то стадию вирусного цикла, происходящую уже после проникновения вируса в клетку, а значит антивирусный эффект не может быть объяснен только нарушением вирусной мембраны или блокированием связывания гликопротеина S с рецептором ACE2.

3. Отзыв ведущей организации, отзыв положительный, содержит 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_{50}) 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. 4) 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?.

Выбор официальных оппонентов и представителей ведущей организации обосновывается их научными достижениями в области биоорганической химии, молекулярной биологии и вирусологии, что подтверждается наличием значительного количества публикаций в данной сфере исследований в ведущих российских и международных научных журналах и изданиях. Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита) является известным научным центром, где ведутся фундаментальные исследования в области молекулярной биологии вирусов, изучение биологии возбудителей инфекционных заболеваний и разработка научных основ создания профилактических и диагностических препаратов медицинского назначения. Профессор Костров С.В. является специалистом в области фундаментальных основ биотехнологии, биохимии и белковой инженерии. Профессор Готтих М.Б. является одним из ведущих специалистов в области биоорганической химии, изучении ВИЧ и его клеточных партнеров, а также разработке подходов к созданию ингибиторов репликации вирусов. Их высокая квалификация в приведенных выше областях позволяет им объективно судить о научной новизне, а также теоретической и

практической значимости диссертационной работы.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований впервые изучена функциональная активность никотиновых холинорецепторов на первичных макрофагах человека и модельных клетках THP-1 с помощью комплекса методов; с помощью α -бунгаротоксина и его флуоресцентного аналога проведена дифференциальная оценка экспрессии $\alpha 7$ холинорецепторов на макрофагах; с использованием селективного агониста PNU 282987 впервые установлено, что стимуляция макрофагальных $\alpha 7$ -рецепторов способствует увеличению экспрессии мембранных белков HLA-DR, CD11b и CD54 и снижает экспрессию рецептора CD14 и продукцию IL-10, в то время как α -бунгаротоксин отменял эти эффекты; впервые установлено, что никотин и ацетилхолин, классические лиганды никотиновых холинорецепторов, не влияют на функциональную активность P2X7 рецепторов в тучных клетках и макрофагах; обнаружено, что фосфолипаза A2 из яда крайта *Bungarus fasciatus* ингибирует рост клеток аденокарцином молочной железы MCF-7 и легкого A549, вызывая клеточный апоптоз/некроз и ингибируя экспрессию маркера пролиферации Ki-67; впервые установлено, что ряд змеиных фосфолипаз A2 обладает выраженным противовирусным эффектом в отношении SARS-CoV-2; обнаружен широкий спектр антивирусной активности змеиных фосфолипаз A2 против различных штаммов ВИЧ и исследованы механизмы противовирусного эффекта.

Теоретическая значимость работы состоит в получении новой информации о роли $\alpha 7$ nAChR в патогенезе сепсиса. В работе впервые продемонстрирована ионотропная активность и потенциальная роль макрофагального $\alpha 7$ nAChR в подавлении иммуносупрессии, которая развивается в процессе воспаления, за счет регуляции мембранных макрофагальных белков и продукции цитокинов при активации $\alpha 7$ -рецепторов. Кроме того, обнаружен и исследован противовирусный эффект ряда змеиных ФЛА2, которые в дальнейшем могут оказаться полезными инструментами для изучения взаимодействия вирусов с клетками-хозяевами.

Все эти исследования имеют также и практическое значение. Полученные результаты и разработка новых селективных агонистов $\alpha 7$ -рецепторов, могут быть использованы в терапевтических целях при лечении пациентов с сепсис-опосредованной иммуносупрессией. Результаты изучения противовирусного эффекта различных змеиных ФЛА2 свидетельствуют о широком спектре антивирусной активности ФЛА2 и об политаргетном механизме действия. При этом важным является то, что ФЛА2 не оказывали токсического действия на используемые культуры клеток. Все это делает перспективным разработку лекарственных средств на основе ФЛА2 для применения в качестве потенциальных противовирусных средств против социально-значимых инфекций.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что идеи работы базируются на тщательном анализе современных научных данных о функциональной экспрессии и биологической роли макрофагальных $\alpha 7$ nAChR в патогенезе сепсиса, а также биологических активностях и механизмах действия змеиных фосфолипаз A2. Работа выполнена на высоком

экспериментальном уровне с применением современных методов анализа и сертифицированного оборудования. Достоверность результатов и обоснованность выводов не вызывают сомнений. Работа дает развитие направлению по разработке новых иммуномодулирующих и противовирусных средств.

Личный вклад соискателя состоит в участии на всех этапах исследования: в разработке гипотезы, постановке цели и задач исследования, выборе методов, планировании и проведении экспериментов, интерпретации результатов. Все экспериментальные результаты работы были получены лично автором, за исключением следующих совместных работ: исследование функциональной активности P2X7 рецепторов на мышинных тучных клетках при их стимуляции холинергическими лигандами проведена в коллаборации с Дилярой Нурхаметовой (Университет Восточной Финляндии), получение трансгенных клеток 293T/ACE2 (группа клеточных и генных технологий, ИБГ РАН), а также исследование цитотоксичности яда *B. Fasciatus* на клетках MCF-7 и A549 (Tra Vinh University, Vietnam).

В ходе защиты диссертации критических замечаний высказано не было. Были заданы следующие уточняющие вопросы:

1. Какие антитела ACE2 и вариант RBD использовался в работе?
2. В работе были использованы рекомбинантные ФЛА2?
3. Принимает ли участие активный центр ФЛА2 при проявлении противовирусного эффекта?
4. Что принципиально нового показано в данной работе, опишите более подробно?
5. Почему ФЛА2 проявляли цитотоксическое действие на раковые клетки, но не оказывали влияния на нормальные?
6. Какой диапазон между токсичностью и проявлением эффекта для ФЛА2?

Соискатель Сиявин А.Э. ответил на все задаваемые ему в ходе заседания вопросы и привел собственную аргументацию:

1. Использовались коммерческие не терапевтические антитела против рецептора ACE2. RBD был использован для варианта вируса «Ухань».
2. В работе использовались ФЛА2 выделенные из яда змей.
3. Один из механизмов противовирусного эффекта заключался в гидролизе фосфолипидов оболочки вируса, и как следствие активный центр принимает прямое участие.
4. В первой части работы впервые установлена ионотропная активность $\alpha 7$ nAHP. Показана его роль не только в сепсисе, но и в последующей фазе – сепсис-индуцированная иммуносупрессия. Впервые с использованием селективного агониста $\alpha 7$ -рецепторов показано влияние на экспрессию ряда макрофагальных мембранных белков и продукции цитокинов. Во второй части работы впервые подробно исследован механизм анти-ВИЧ эффекта. Также впервые изучена активность ФЛА2 в отношении SARS-CoV-2.
5. Онкотрансформация клеток приводит к изменению их липидного метаболизма. Изменяется и состав мембраны, в частности, начинает преобладать в том числе и фосфатидилсерин. По всей

видимости, за счет таких изменений ФЛА2 проявляет большую селективность в гидролизе мембраны раковых клеток, что в дальнейшем приводит к запуску различных сигнальных каскадов.

6. ФЛА2 проявили цитотоксический эффект в концентрациях выше 100 мкг/мл, а противовирусный на несколько порядков ниже, что указывает на их высокий терапевтический индекс. Летальные дозы на животных планируется изучить в будущих исследованиях.

На основании всего вышеизложенного Диссертационный совет 24.1.037.01 заключает, что диссертационная работа Синявина Андрея Эдуардовича является законченной научно-квалификационной работой в области биоорганической химии, в которой решено несколько важных научных проблем, а именно определение функциональной активности макрофагальных $\alpha 7$ nAХР и их роли в патогенезе сепсис-индуцированной иммуносупрессии, а также антипролиферативного и противовирусного потенциала змеиных ФЛА2, что вносит существенный вклад в развитие таких областей знаний как биоорганическая химия, молекулярная биология, вирусология, биохимия, а также создает предпосылки для практического применения полученных результатов.

По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, личному вкладу и полноте изложения результатов диссертация отвечает требованиям пп. 9-14 "Положения 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 диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук.

На заседании 15 июня 2022 г. диссертационный совет принял решение присудить Синявину Андрею Эдуардовичу ученую степень кандидата химических наук. При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 8 докторов наук (по специальности рассматриваемой диссертации 1.4.9 – Биоорганическая химия), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 20, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Заместитель председателя
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

