

на правах рукописи

Синявин  
Андрей Эдуардович

**$\alpha$ -Нейротоксины и фосфолипазы A2 змеиных ядов в исследовании процессов репродукции вирусов и патогенеза воспаления**

Специальность 1.4.9 – биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата химических наук

Москва - 2022

Работа 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).

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор, чл-корр. РАН **Виктор Ионович ЦЕТЛИН**

Официальные оппоненты:

**Костров Сергей Викторович**, профессор, доктор химических наук, член-корр. РАН  
Директор Федерального государственного бюджетного учреждения Научно-исследовательского центра «Курчатовский институт – Институт молекулярной генетики».

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

Ведущая организация:

**Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова Российской академии наук (Институт полиомиелита).**

Защита диссертации состоится 15 июня 2022 г. в 11.00 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.037.01. при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, Москва, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, а также на сайте ИБХ РАН <http://www.ibch.ru>.

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор физико-математических наук



**В. А. Олейников**

## Характеристика работы

### Актуальность проблемы

Сигналы блуждающего нерва, передаются на цитокин-продуцирующие клетки, которые экспрессируют  $\alpha 7$  никотиновый ацетилхолиновый рецептор (nAChR).  $\alpha 7$  nAChR является важным компонентом «холинергического противовоспалительного пути», поскольку активация этого рецептора снижает высвобождение некоторых цитокинов. Цитокины - это небольшие белковые молекулы, которые облегчают связь между клетками иммунной системы и другими тканями, а также запускают различные иммунологические процессы. Их воздействие вызывает активацию различных клеток, способствуя ремоделированию тканей и координации местного клеточного ответа на воспаление. Величина цитокинового ответа тщательно регулируется, так как избыток или недостаток активности цитокинов может нарушить функцию органа, вызвать шок и повреждение тканей. Одним из основных цитокинов, продуцируемом при сепсисе, является TNF- $\alpha$ , а его избыточная продукция, так же, как и других провоспалительных цитокинов, может вызывать патофизиологию многих заболеваний. Молекулярные и гуморальные механизмы защищают организм от избытка цитокинов, активируя гипоталамо-надпочечниковую глюкокортикоидную систему и противовоспалительный цитокиновый каскад. Эти гуморальные системы являются защитными, но они действуют относительно медленно и не интегрированы. Недавно обнаруженный «холинергический противовоспалительный путь», связывающий нервную и иммунную систему, является быстрым механизмом, который может подавлять цитокиновый ответ. Агонисты  $\alpha 7$  nAChR ингибируют высвобождение провоспалительных цитокинов и защищают животных 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  $\alpha 7$  nAChR еще предстоит выяснить. Помимо этого, в недавних исследованиях показано, что различные лиганды nAChR эффективно блокируют АТФ-зависимое высвобождение IL-1 $\beta$  из моноцитов, тем самым указывая на возможные взаимодействия nAChR и пуринергических рецепторов P2X7. Однако, вероятное перекрестное взаимодействие nAChR и P2X7 рецепторов остается неизученным. Достижения в выяснении молекулярной структуры и функции  $\alpha 7$  nAChR способствовали лучшему пониманию механизмов, касающихся его сборки, экспрессии и функциональных ответов. Холинергический противовоспалительный путь можно использовать с терапевтической пользой для лечения заболеваний, вызванных чрезмерной активностью цитокинов. Предстоящие *in vitro* и *in vivo* исследования нейроиммунных взаимодействий, лежащих в основе этого противовоспалительного пути, будут способствовать раскрытию его терапевтического потенциала и соответствующих иммунорегуляторных механизмов.

Змеиный яд может содержать более сотни различных белков, большинство из которых принадлежит к относительно небольшому количеству структурных суперсемейств с однотипной внутри каждого семейства трехмерной структурой, но с различными физиологическими мишенями и фармакологическими эффектами. Одними из компонентов змеиного яда являются  $\alpha$ -нейротоксины - ценные фармакологические инструменты, которые с высокой аффинностью связываются с определенными подтипами nAChR. Другими компонентами змеиного яда, обладающими ферментативной активностью, являются фосфолипазы А2 (ФЛА2). Исследования показывают, что некоторые змеиные ФЛА2 взаимодействуют и с  $\alpha 7$  nAChR, а также проявляют различные биологические эффекты, что делает их важным источником для создания потенциальных терапевтических агентов.

ФЛА2 представляют собой группу ферментов, которые специфически распознают sn-2-ацильную связь в мембраносвязанных фосфолипидах и катализируют ее последующее расщепление, высвобождая арахидоновую кислоту и лизофосфолипиды. При последующей модификации циклооксигеназами и липоксигеназами, арахидоновая кислота превращается в простагландины и лейкотриены, соответственно. Катализ фосфолипидов также приводит к образованию лизофосфолипидов, которые представляют другой класс липидных медиаторов. Ферменты ФЛА2 широко распространены в бактериях, растениях, ядах змей и пчел, а также в клетках и секретах млекопитающих. Они представляют собой повсеместно 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. Поскольку канцерогенез и гиперкоагуляция способствуют друг другу, змеиные ФЛА2, обладающие как антипролиферативными, так и антикоагулянтными свойствами, являются многообещающими кандидатами в исследованиях рака. Применение ФЛА2 для изучения антипролиферативных эффектов может способствовать открытию нового биохимического механизма ингибирования роста опухолевых клеток. ФЛА2, полученные из ядовитых змей, обладают мощной нейтрализующей активностью против вируса Денге и Желтой лихорадки за счет разрушения липидных бислоев вирусной оболочки. ФЛА2 человека также проявляет вирулицидную активность против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Исследования ФЛА2 из змеиного яда подчеркивают потенциальное использование этих белков для разработки противовирусных препаратов широкого спектра действия.

Таким образом, 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.

### **Цель и задачи исследования**

Как отмечено выше, работа велась по двум направлениям: 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  $\alpha$ -бунгаротоксина. Второе направление работы было посвящено исследованию цитотоксической активности ряда змеиных фосфолипаз А2 против раковых клеток и их антивирусной активности. Основанием для этой работы служат проводимые в Отделе молекулярной нейроиммунной сигнализации исследования пептидов и белков из различных животных ядов для изучения различных подтипов НАХР. Среди них имеется богатый набор пептидных и белковых нейротоксинов, характеризующихся различиями в избирательности взаимодействия с определенными подтипами НАХР. Яды змей содержат белки как обладающие, так и не обладающие ферментативной активностью. Ферментативно активные белки включают семейство ФЛА2. В связи с имевшейся информацией о различных видах биологической активности некоторых ФЛА2, их участии в воспалительных процессах, а также антивирусных эффектах, нам представлялось целесообразным проанализировать не исследованную ранее их активность против вируса SARS-CoV-2 (возбудитель COVID-19) и более детально исследовать механизм анти-ВИЧ активности.

Таким образом, в рамках упомянутых выше двух направлений исследований были поставлены следующие задачи:

1. Исследование экспрессии мРНК различных субъединиц nAXP и функциональных  $\alpha 7$ -рецепторов на макрофагах человека с использованием комбинации методов ПЦР, кальциевого имиджинга, цитохимического окрашивания флуоресцентным аналогом  $\alpha$ -бунгаротоксина и электрофизиологии.
2. Оценка экспрессии профиля макрофагальных мембранных маркеров (CD54, CD11b, CD14, HLA-DR) при активации  $\alpha 7$ -рецепторов с использованием PNU 282987, селективного агониста  $\alpha 7$ -рецепторов.
3. Определение продукции цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10) при активации  $\alpha 7$ -рецепторов с помощью PNU 282987 в LPS-стимулированных макрофагах.
4. Исследование влияния классических лигандов nAXP на активность P2X7 рецепторов в тучных клетках и макрофагах в контексте «холинергического противовоспалительного пути».
5. Исследование механизмов цитотоксичности и противовирусной активности различных змеиных ФЛА2 в отношении ВИЧ и возбудителя COVID-19 - SARS-CoV-2.

### **Научная новизна**

В данной работе впервые проведены детальные исследования функциональной активности nAXP на макрофагах человека с использованием комбинации различных методов. Установлено, что в большей степени, по сравнению с другими подтипами nAXP, макрофаги экспрессируют функциональный рецептор  $\alpha 7$ -типа. Активация макрофагального  $\alpha 7$  nAXP с помощью селективного агониста PNU 282987 способствовала усилению экспрессии мембранных маркеров HLA-DR, CD11b и CD54, в то время как экспрессия мембранного рецептора CD14 и продукция цитокина IL-10 снижалась. Проверена возможность взаимодействия  $\alpha 7$  nAXP и P2X7 рецепторов на мышиных тучных клетках и макрофагах человека в контексте «Холинергического противовоспалительного пути» и при этом установлено, что классические лиганды nAXP не оказывают какого-либо влияния на функциональную активность P2X7 рецепторов.

В работе также была впервые продемонстрирована противовирусная активность ряда змеиных фосфолипаз A2 против возбудителя COVID-19 (SARS-CoV-2). Обнаружено, что высокой противовирусной активностью обладали димерные ФЛА2, выделенные из яда гадюки Никольского *Vipera nikolskii*. Проведено моделирование взаимодействия фосфолипазы HDP-2P с рецептором ACE2 и RBD SARS-CoV-2. В функциональных тестах было обнаружено, что инкубация HDP-2P с клетками 293T/ACE2 приводит к снижению связывания anti-ACE2 антител и рекомбинатного белка RBD. Помимо этого, с помощью трансмиссионной электронной микроскопии было выяснено, что HDP-2 приводит к существенным морфологическим изменениям SARS-CoV-2, тем самым инактивируя вирус.

В данной диссертационной работе впервые подробно изучена и противовирусная активность змеиных ФЛА2 против ВИЧ. Димерная ФЛА2 HDP-2 показала широкий спектр антиретровирусной активности против псевдовирюсов с различными субтипами, ВИЧ-2 и ряда высокопатогенных лабораторных штаммов ВИЧ-1. Механизмы противовирусной активности ФЛА2 заключались в вирулицидной активности, блокировании синцитиеобразования, а также в ингибировании связывания ВИЧ-1 с перmissive клетками.

### **Область применения и практическая значимость**

Практическая значимость работы состоит в получении новой информации о роли  $\alpha 7$  nAXP в патогенезе сепсиса. Известно, что активация  $\alpha 7$ -рецептора на клетках иммунной системы приводит к снижению продукции противовоспалительных цитокинов. В данной работе впервые

продемонстрирована потенциальная роль  $\alpha 7$  nAHP в подавлении иммуносупрессии которая развивается в процессе воспаления, за счет регуляции мембранных макрофагальных белков и продукции цитокинов при активации  $\alpha 7$ -рецепторов. Полученные результаты и разработка новых селективных агонистов  $\alpha 7$ -рецепторов, могут быть использованы в терапевтических целях при лечении пациентов с сепсис-опосредованной иммуносупрессией.

Практическая значимость работы заключается и в открытии противовирусной активности ряда змеиных ФЛА2 против SARS-CoV-2 и ВИЧ. Результаты данной работы свидетельствуют о широком спектре антивирусной активности ФЛА2 и о политаргетном механизме действия. При этом важным является то, что ФЛА2 не оказывали токсического действия на используемые культуры клеток. Разработка лекарственных средств на основе ФЛА2 может иметь практическую значимость для их применения в качестве потенциальных противовирусных средств против социально-значимых инфекций.

### **Апробация работы и публикации**

По основным материалам диссертации сделаны устные доклады на международной конференции IAS COVID-19 в 2021 г. и международном иммунологическом конгрессе EAACI в 2019 г. По теме диссертационной работы опубликовано 7 статей в рецензируемых журналах.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из разделов “Введение”, “Обзор литературы”, “Материалы и методы”, “Результаты”, “Обсуждение”, “Выводы”, благодарности, а также списка цитируемой литературы, в который входит 285 ссылок. Работа изложена на 181 странице печатного текста, содержит 2 таблицы и 41 рисунок.

## Основное содержание работы

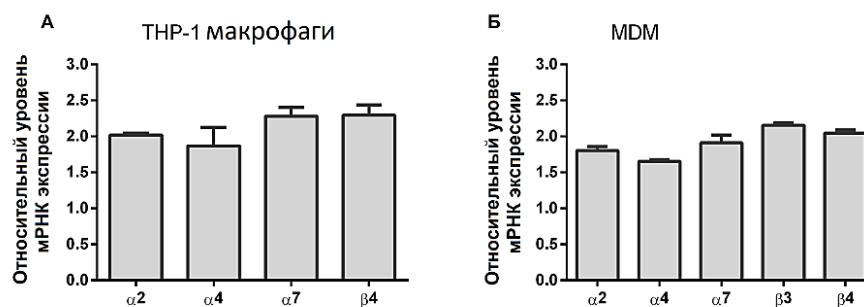
### 1 Литературный обзор

Обзор литературы представлен в первой главе диссертации и включает в себя два раздела. Первый раздел посвящен описанию структуры, экспрессии и биологической роли  $\alpha 7$  нАХР в «Холинергическом противовоспалительном пути». Во втором разделе представлен обзор основных групп суперсемейства фосфолипаз А<sub>2</sub>, их механизмов действия, а также потенциального фармакологического применения.

### 2 Экспериментальная часть

#### 2.1 Оценка экспрессии субъединиц нАХР и функциональной активности $\alpha 7$ нАХР в макрофагах человека.

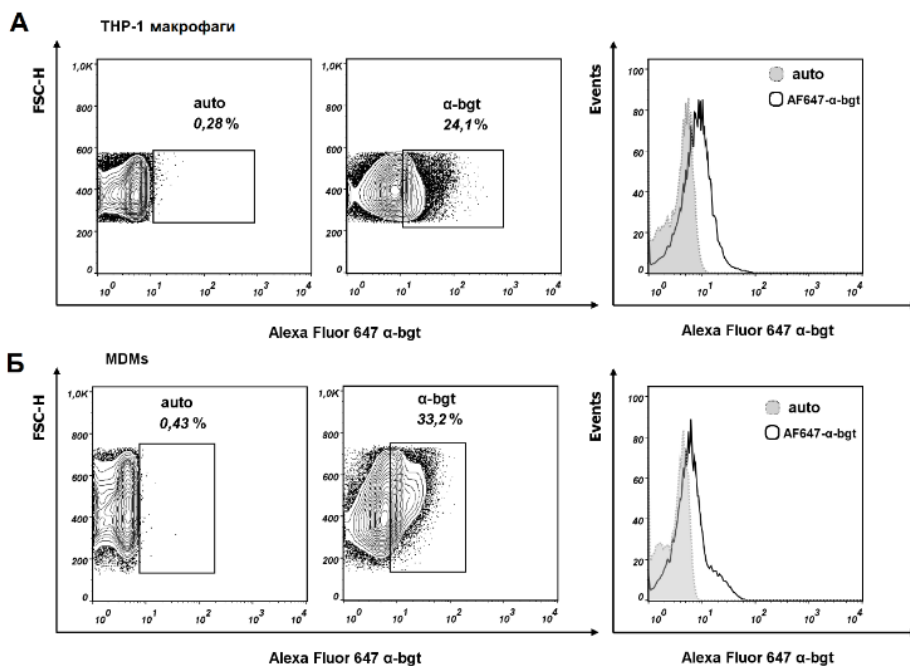
Для исследования экспрессии мРНК субъединиц нАХР была проведена количественная ПЦР с использованием кДНК первой цепи, полученной из макрофагов ТНР-1 (ТНР-1Мф) или первичных человеческих макрофагов (MDM) (Рис. 1). Транскрипт  $\alpha 1$  субъединицы нАХР мышечного типа достоверно не был обнаружен в ТНР-1ф и MDM. Присутствие транскриптов нескольких нейрональных субъединиц нАХР ( $\alpha 3$ ,  $\alpha 9$ ,  $\beta 2$ ) также не было детектировано. Все другие транскрипты субъединиц нАХР человека ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 7$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ) были обнаружены со сходными уровнями экспрессии.



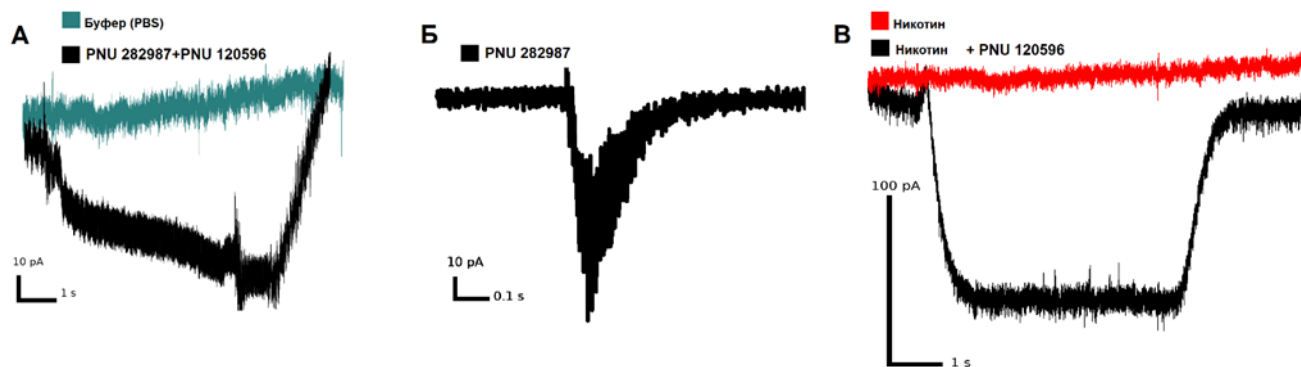
**Рисунок 1.** Относительный уровень экспрессии мРНК транскриптов субъединиц нАХР А) в макрофагах, полученных из моноцитарных клеток человека (ТНР-1Мф) и Б) макрофагах, происходящих из моноцитов (MDM); исследование проведено с помощью qOT-ПЦР.

Экспрессию  $\alpha 7$ -рецептора на клеточной мембране макрофагов, полученных после дифференцировки клеток ТНР-1 (ТНР-1Мф) и первичных моноцитов (MDM), анализировали с использованием флуоресцентно-меченного  $\alpha$ -бунгаротоксина, антагониста  $\alpha 7$  нАХР (AF647- $\alpha$ -bgt). Связывание AF647- $\alpha$ -bgt было четко обнаружено как на ТНР-1Мф (Рис. 2А), так и на MDM (Рис. 2Б).

Эксперименты с использованием электрофизиологии и метода локальной фиксации потенциала показали, что  $\alpha 7$ -рецептор, экспрессируемый на ТНР-1Мф, функционирует как ионный канал. На Рис. 3А показана типичная кривая тока, записанная с ТНР-1Мф при одновременном применении 1  $\mu$ M PNU 282987 и 10  $\mu$ M PNU 120596.



**Рисунок 2.** Анализ с помощью проточной цитометрии. Экспрессия  $\alpha 7$  рецепторов на поверхности клеток А) ТНР-1Мф и Б) МДМs после окрашивания  $\alpha$ -бунгаротоксином, меченным с Alexa Fluor 647 (AF647- $\alpha$ -bgt).



**Рисунок 3.** Метод локальной фиксации потенциала с использованием ТНР-1Мф. Репрезентативные токи для А) буфера (зеленая линия) или  $1 \mu\text{M}$  PNU 282987 совместно с  $10 \mu\text{M}$  PNU 120596 (черная линия), Б)  $1 \mu\text{M}$  PNU 282987 и В)  $10 \mu\text{M}$  никотина (красная линия) или  $10 \mu\text{M}$  никотина с  $10 \mu\text{M}$  PNU 120596 (черная линия), которые были апплицированы на клетки.

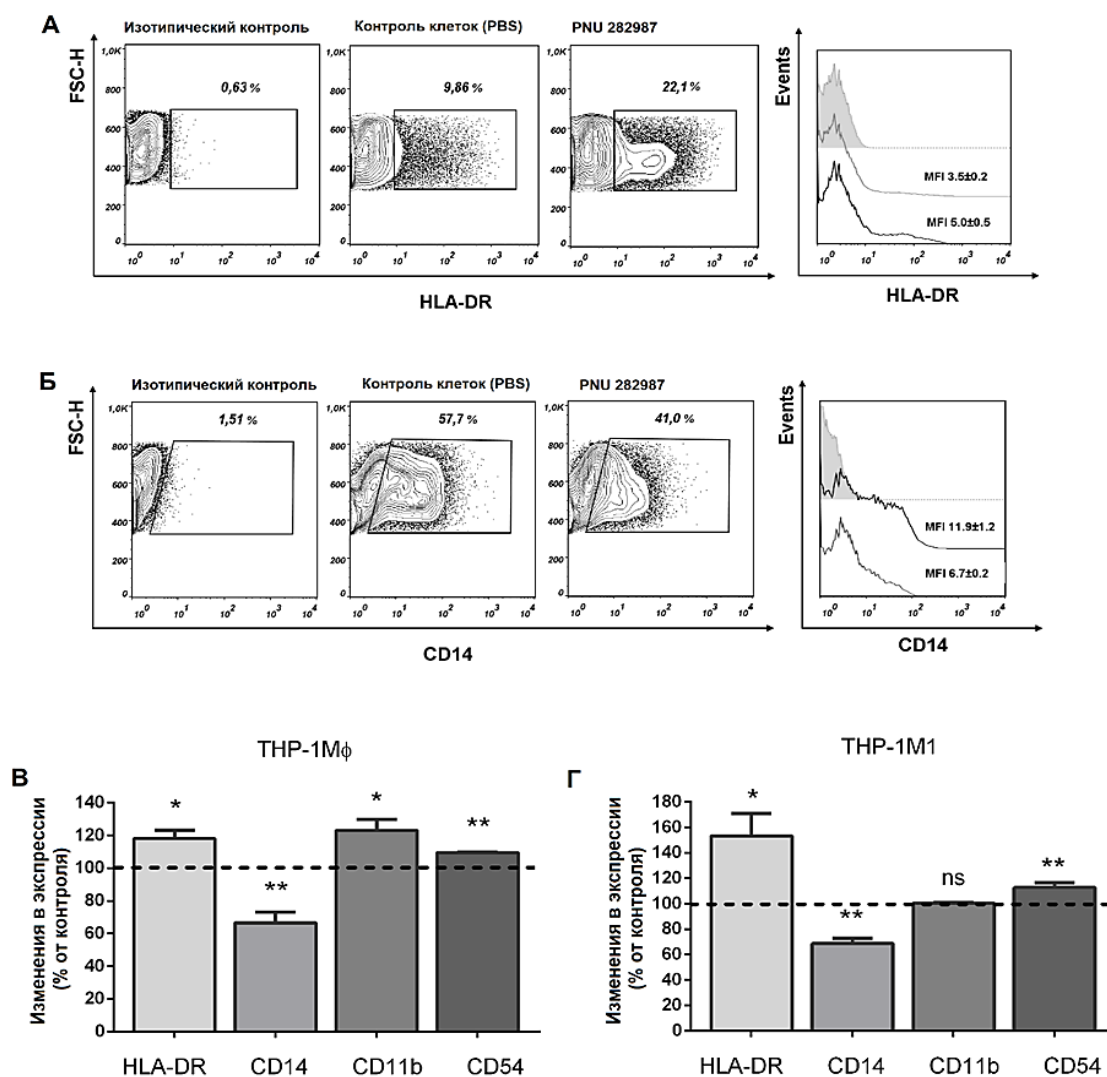
Таким образом было установлено, что ТНР-1Мф и МДМ экспрессируют функциональный  $\alpha 7$  нАХР, и могут служить удобной моделью *in vitro* для изучения роли  $\alpha 7$  нАХР в различных иммунопатологических процессах.

## 2.2 Исследование экспрессии HLA-DR, CD11b, CD54 и CD14 при активации $\alpha 7$ -рецепторов на макрофагах с использованием PNU 282987.

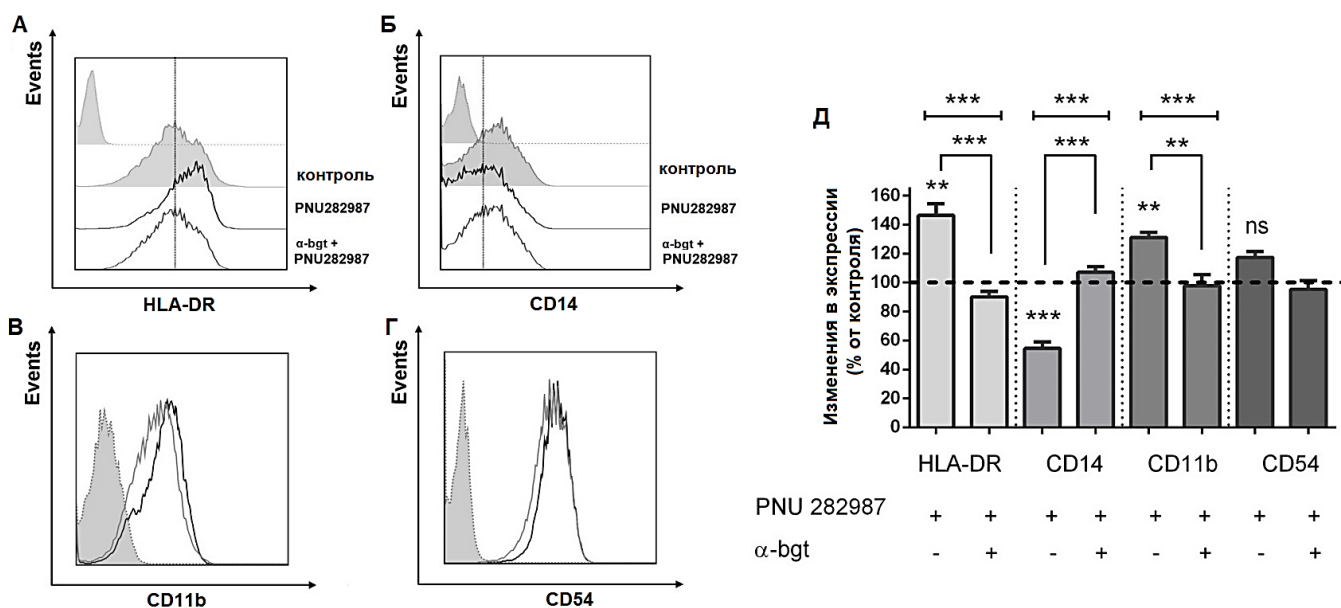
В ходе работы было исследовано, как влияет активация  $\alpha 7$  нАХР на экспрессию таких мембранных молекул и рецепторов, как HLA-DR и CD14, а также CD11b и CD54, участвующих в воспалительных процессах и межклеточных взаимодействиях. Моноциты ТНР-1 или первичные моноциты человека были дифференцированы в макрофаги, после чего макрофаги ТНР-1 поляризовали в классически активированные макрофаги (M1) с помощью IFN- $\gamma$  ( $20 \text{ ng/ml}$ ) и LPS *E. coli* ( $100 \text{ ng/ml}$ ). Эффект селективного агониста  $\alpha 7$ -рецепторов PNU 282987 на экспрессию макрофагальных мембранных белков на клетках ТНР-1Мф, ТНР-1М1 или МДМ изучали после 48 ч активации (Рис. 4).



Обработка клеток PNU 282987 индуцировала 20% повышение экспрессии HLA-DR во время созревания THP-1Mφ (Рис. 4В). Данный агонист индуцировал заметное (~50%) увеличение экспрессии молекул HLA-DR в классически активированных макрофагах THP-1M1 (Рис. 4А, Г). Действие PNU 282987 на клетки THP-1Mφ и THP-1M1 приводило к ингибированию экспрессии рецептора CD14 (Рис. 4Б,Г). Более того, PNU 282987 увеличивал экспрессию молекул адгезии макрофагов CD54 и рецептора комплемента CD11b (Рис. 4В, Г). Влияние PNU 282987 на экспрессию перечисленных выше мембранных белков также оценивали с использованием MDM: наблюдалось увеличение HLA-DR (Рис. 5А) и снижение экспрессии CD14 (Рис. 5Б). Антагонист α7-рецепторов - α-bgt (10 μM) приводил к отмене эффектов, индуцированных PNU 282987 (Рис. 5Д).



**Рисунок 4.** Репрезентативный профиль экспрессии HLA-DR и CD14 на макрофагах THP-1 и анализ влияния PNU 282987 на экспрессию мембранных рецепторов, участвующих в воспалении, на клетках THP-1Mφ и THP-1M1. PNU 282987 приводил к изменениям в уровне экспрессии мембранных белков А) HLA-DR, Б) CD14, а также CD11b и CD54 на В) THP-1Mφ и на Г) THP-1M1.

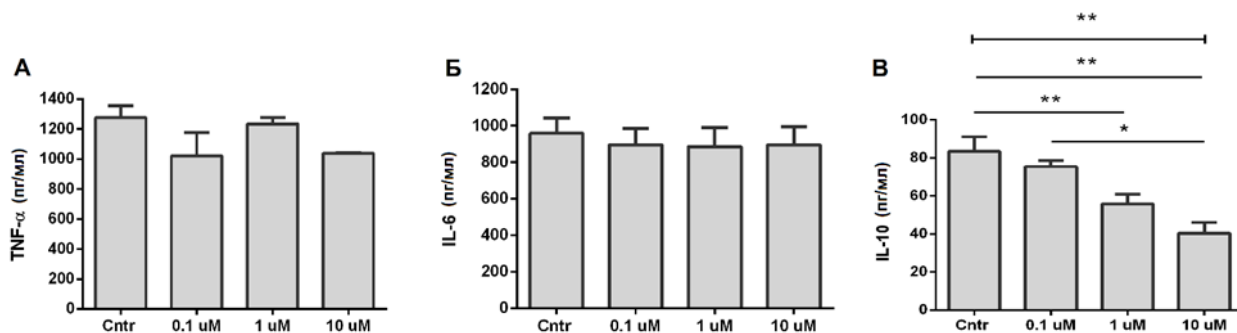


**Рисунок 5.** Репрезентативные гистограммы и анализ влияния PNU 282987 на экспрессию HLA-DR, CD14, CD54 и CD11b в MDM. Показаны уровни экспрессии А) HLA-DR и Б) CD14 в PNU 282987 обработанных, необработанных (контроль) и PNU 282987+ $\alpha$ -bgt обработанных MDM. PNU 282987 индуцировал увеличение экспрессии А) молекул HLA-DR, В) CD11b, Г) CD54 и снижал экспрессию Б) CD14; Д) Диаграмма изменения экспрессии мембранных белков.

По результатам данной части работы было обнаружено, что посредством активации  $\alpha 7$  нАХР становится возможным регулировать экспрессию целого ряда макрофагальных мембранных белков, участвующих в Т-клеточных взаимодействиях и в презентации антигена.

### 2.3 Оценка продукции TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-10 в процессе активации $\alpha 7$ нАХР с использованием PNU 282987.

Продукция цитокинов при активации  $\alpha 7$  нАХР с помощью PNU 282987 была изучена в LPS-стимулированных макрофагах THP-1. Стимуляция клеток с помощью LPS в присутствии PNU 282987 не приводила к существенным изменениям продукции TNF- $\alpha$  (Рис. 6А). Активация  $\alpha 7$  нАХР с помощью PNU 282987 не влияла на высвобождение IL-6 при любой из протестированных концентраций (Рис. 6Б). Однако, было обнаружено дозозависимое ингибирование LPS-индуцированного высвобождения IL-10 в макрофагах, обработанных PNU 282987 (Рис. 6В).



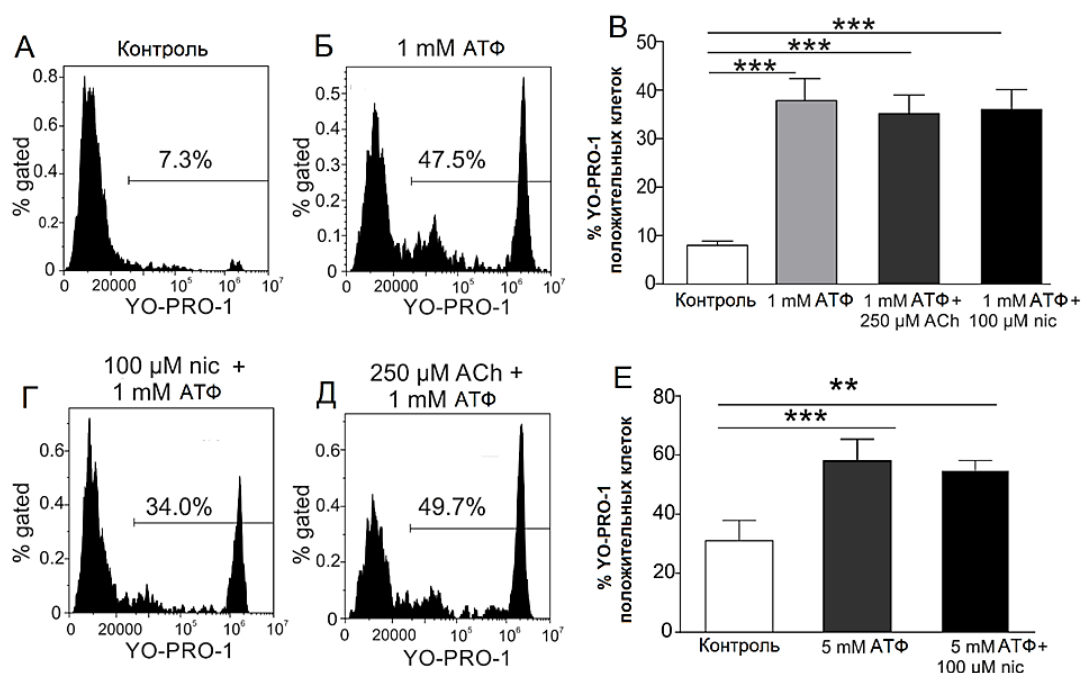
**Рисунок 6.** Уровни содержания цитокинов в культуральной среде. Макрофаги THP-1Мф обрабатывали различными дозами PNU 282987, после чего производили стимуляцию LPS. Уровни А) фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Б) интерлейкина (IL) -6 и В) IL-10 определяли спустя 24 ч с помощью ИФА.

При септическом шоке наблюдается усиление выработки IL-10, что коррелирует с повышенной смертностью и вторичными инфекциями. Кроме того, IL-10 участвует в подавлении экспрессии HLA-DR и различных костимулирующих рецепторов. Мы обнаружили, что PNU 282987 дозозависимо ингибирует выработку IL-10 в LPS-активированных макрофагах, что указывает на важную роль  $\alpha 7$ -рецепторов в снижении иммуносупрессивного состояния.

#### 2.4 Изучение влияния холинергических лигандов $\alpha 7$ nAHP на функциональную активность P2X7 рецепторов в тучных клетках и макрофагах.

Недавние исследования показали, что стимуляция различных типов иммунных клеток с помощью холинергических агонистов, приводит к полному блокированию АТФ-индуцированного высвобождения IL-1 $\beta$ , опосредованного P2X7 рецепторами. В ходе работы мы решили изучить перекрестное влияние агонистов nAHP на функциональную активность P2X7 рецепторов на тучных клетках и макрофагах.

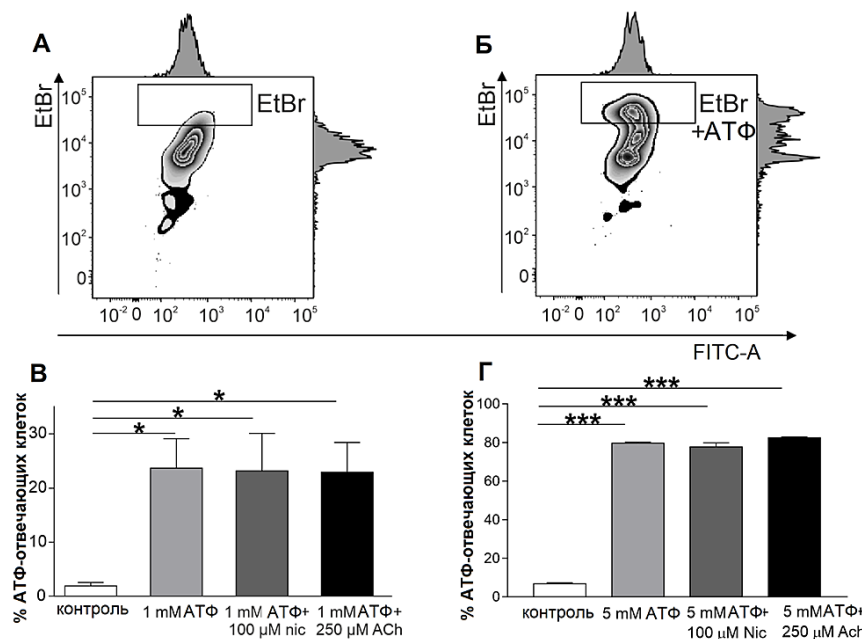
Краситель YO-PRO-1 был использован для обнаружения открытия каналов рецептора P2X7, в частности, больших пор, связанных с активацией инфламасом. Полученные данные показывают, что стимуляция мышечных тучных клеток с помощью АТФ в присутствии ацетилхолина (250  $\mu$ M) или никотина (100  $\mu$ M) не влияла на функциональную активность P2X7 рецепторов, запускаемую АТФ (Рис. 7 В-Е), по сравнению со стимуляцией только АТФ (Рис. 7 А-В).



**Рисунок 7.** Репрезентативные гистограммы поглощения YO-PRO-1 тучными клетками. А) Отрицательный контроль - тучные клетки мыши, инкубированные с 1  $\mu$ M YO-PRO-1. Б) Тучные клетки, инкубированные с 1 mM АТФ. Г) Тучные клетки, предварительно инкубированные со 100  $\mu$ M никотина, с последующей стимуляцией 1 mM АТФ. Д) Тучные клетки, предварительно инкубированные с 250  $\mu$ M ацетилхолина с последующей стимуляцией 1 mM АТФ. В) и Е) Гистограммы, показывающие процент YO-PRO-1-положительных клеток при стимуляции лигандами nAHP.

Для проверки того, может ли холинергическая стимуляция уменьшить открытие больших пор P2X7 после стимуляции АТФ в MDM, мы использовали анализ поглощения этидия бромидом

(EtBr). Обнаружено, что инкубация с АТФ индуцировала значительное поглощение этого красителя в MDM (Рис. 8). В присутствии 1 мМ АТФ доля отвечающих клеток увеличивалась с  $1,9 \pm 0,6\%$  до  $23,6 \pm 5,4\%$ . После инкубации с 5 мМ АТФ, доля окрашенных бромидом этидия клеток составила  $87,3 \pm 0,5\%$  по сравнению с  $7,0 \pm 0,8\%$  в контроле. Тем не менее, как и в случае с тучными клетками, ни ацетилхолин (250  $\mu\text{M}$ ), ни никотин (100  $\mu\text{M}$ ) не снижали АТФ индуцированное поглощение этидия (Рис. 8В, Г).

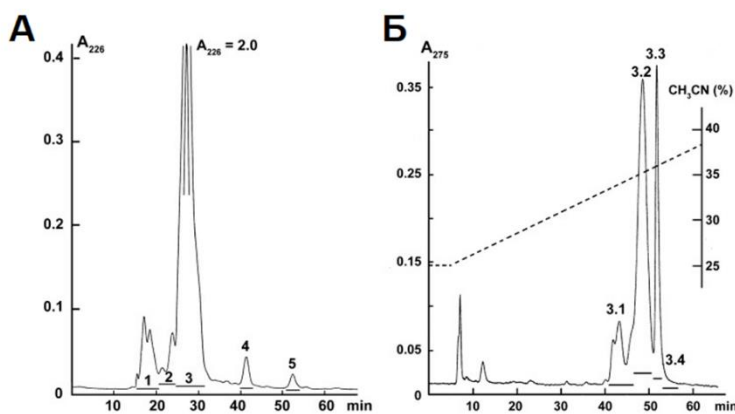


**Рисунок 8.** АТФ-индуцированное поглощение бромидом этидия (EtBr) макрофагами, полученными из моноцитов (MDM). А) Репрезентативный dot-плот анализ поглощения EtBr в контроле. Б) Репрезентативный dot-плот поглощения EtBr в присутствии 1 мМ АТФ. Гистограммы, показывающие процент EtBr-положительных клеток в контроле, в присутствии В) 1 мМ АТФ или Г) 5 мМ АТФ, до и после преинкубации со 100  $\mu\text{M}$  никотина или 250  $\mu\text{M}$  ацетилхолина.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в иммунных клетках холинергические агенты не действуют на функциональную активность P2X7 рецепторов, но могут опосредовать противовоспалительный эффект через механизм лежащий после АТФ-управляемой передачи сигналов.

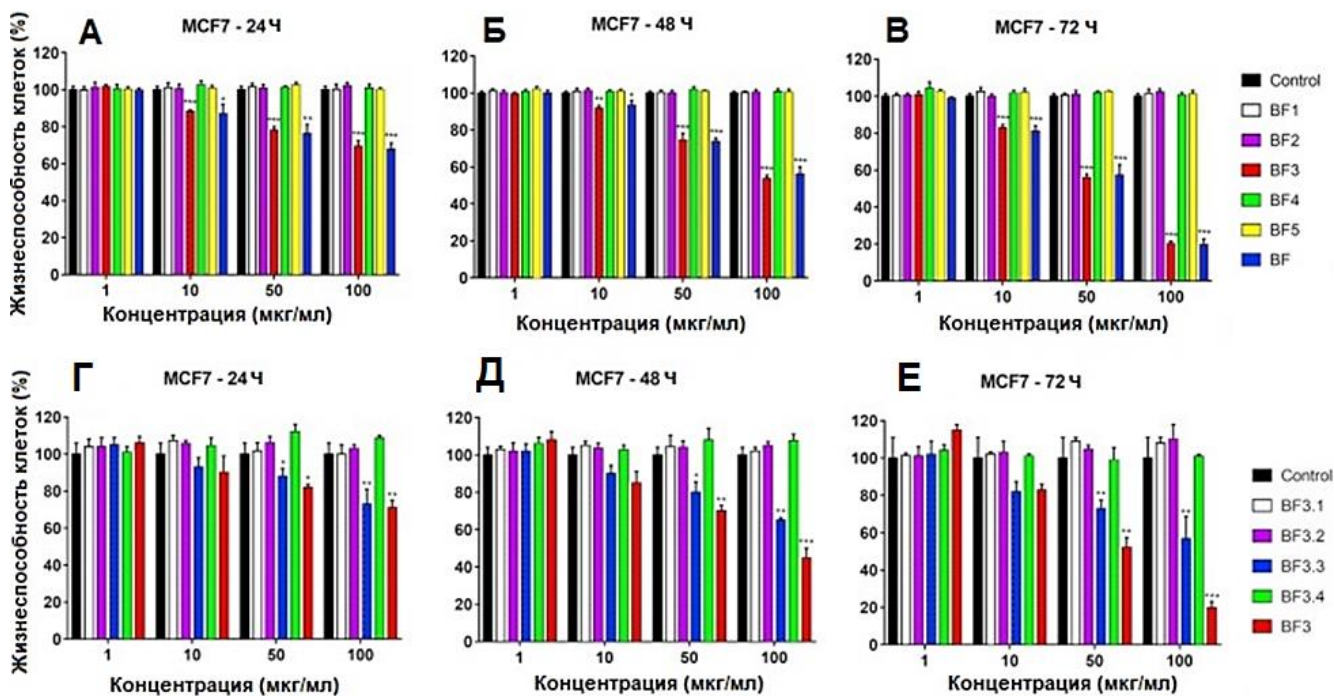
#### 2.4 Исследование цитотоксического действия ФЛА2 из яда крайта *Bungarus fasciatus* в отношении раковых клеток.

$\alpha$ -Нейротоксины, включая  $\alpha$ -бунгаротоксин, широко используются в качестве инструментов идентификации различных подтипов nAChR при анализе воспалительных процессов в клетках иммунной системы, в то время как для змеиных ФЛА2 имеются примеры их вовлеченности в воспалительные реакции, а также широкий спектр биологических активностей, в зависимости от их строения и источника выделения. В рамках данной работы мы исследовали цитотоксическую активность ФЛА2 из яда *Bungarus fasciatus*. Для выделения активного соединения, обладающего цитотоксическим действием, яд подвергали фракционированию с помощью жидкостной хроматографии. Гель-фильтрация на колонке Superdex 75 использовалась в качестве первой стадии. В результате было получено пять фракций (Рис. 9А).



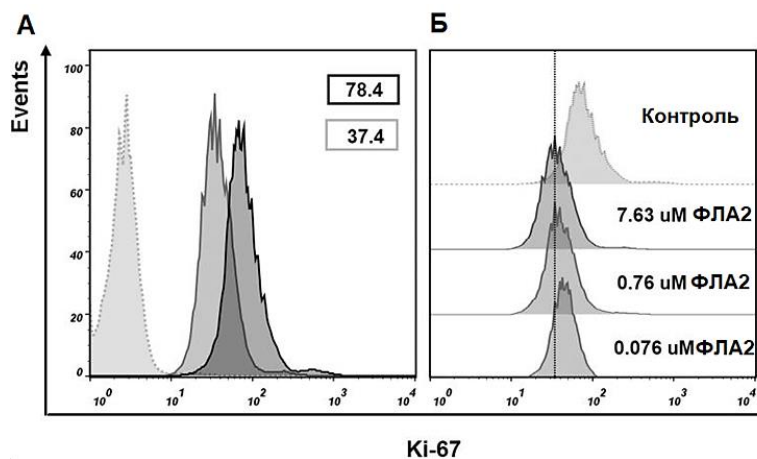
**Рисунок 9.** Фракционирование яда крайта *B. fasciatus*. А) Гель-фильтрация сырого яда на колонке Superdex® 75 10/300 GL (1 × 30 см). Б) Обращенно-фазовая хроматография фракции 3 (из А) на колонке Jupiter C18 (10 × 250 мм). Горизонтальные полосы указывают на собранные фракции.

После лиофилизации фракции проверяли на цитотоксичность в отношении клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 (Рис. 10). Было обнаружено, что только фракция BF3 способна проявлять цитотоксичность на клетках MCF-7. После 72 ч инкубации при концентрации 100 мкг/мл, процент жизнеспособности клеток MCF-7 снизился до 20%. Аналогичные результаты были получены для клеток аденокарциномы легкого – A549.



**Рисунок 10.** Цитотоксичность фракций, полученных из яда *B. fasciatus* в отношении клеток MCF-7. Жизнеспособность клеток исследовали с помощью колориметрического анализа МТТ. А – В) BF1 – BF5 соответствуют фракциям 1–5 на Рис. 9А. BF – яд *B. fasciatus*. Г – Е) Фракции, полученные после обращено-фазовой хроматографии (Рис. 9Б). BF3.1 – BF3.4 соответствуют фракциям 3.1–3.4 на Рис. 9Б. BF3 фракция 3 с Рис. 9А.

Анализ активной фракции BF3 с помощью масс-спектрометрии MALDI выявил присутствие нескольких белков. Наблюдались интенсивные сигналы при  $m/z$  около 13000. В яде *B. fasciatus* только ФЛА2 могут обладать молекулярной массой в этом диапазоне. Чтобы выяснить, влияет ли выделенная ФЛА2, содержащаяся в фракции BF7.3, на пролиферацию клеток, мы оценили экспрессию Ki-67 (маркер пролиферации) в клетках MCF-7, обработанных этим белком. После обработки 7,63  $\mu\text{M}$  ФЛА2 в течение 24 ч, с использованием проточной цитометрии было обнаружено снижение доли Ki-67-положительных клеток (Рис. 11).



**Рисунок 11.** Исследование экспрессии Ki-67 в клетках MCF-7 с помощью проточной цитометрии. Гистограммы и цифры в дот-плотах показывают различия в уровне экспрессии Ki-67 в обработанных ФЛА2 и контрольных клетках. А) Гистограммы контрольных (серая) и ФЛА2 обработанных (черная) клеток. Б) Изменения уровня экспрессии Ki-67 в контрольных клетках и клетках, обработанных различными дозами ФЛА2.

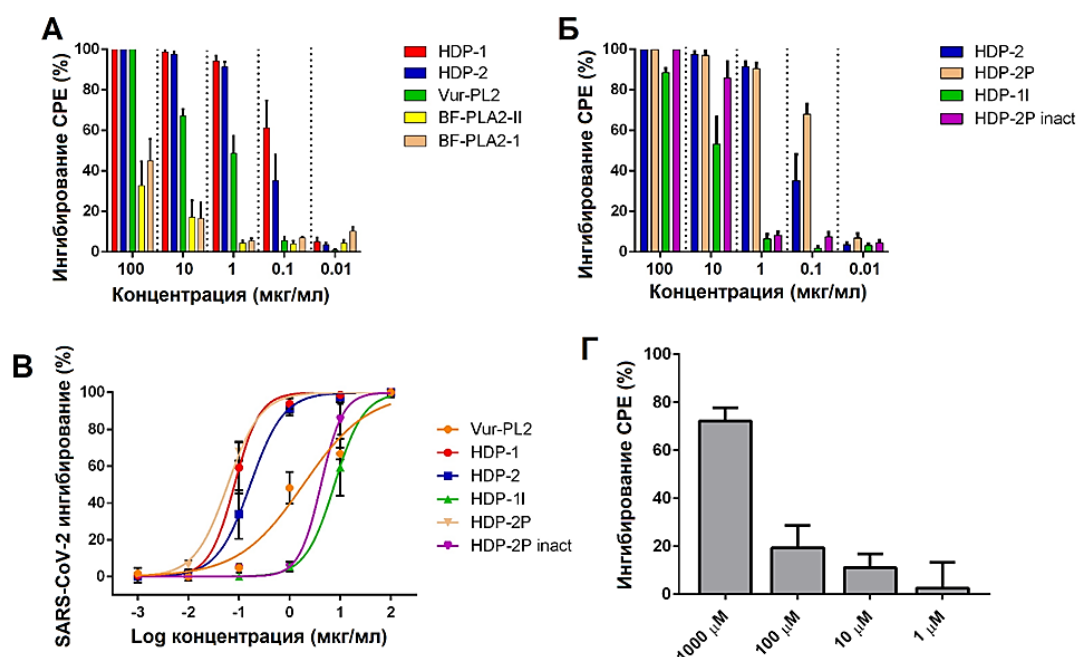
В результате впервые была обнаружена ФЛА2 из яда крайта *B. fasciatus*, которая обладает цитотоксическим действием по отношению к раковым клеткам человека.

## 2.5 Исследование противовирусной активности змеиных ФЛА2 против возбудителя COVID-19 (SARS-CoV-2).

В продолжении темы исследований биологических активностей змеиных ФЛА2, была изучена их противовирусная активность в отношении нескольких вирусов.

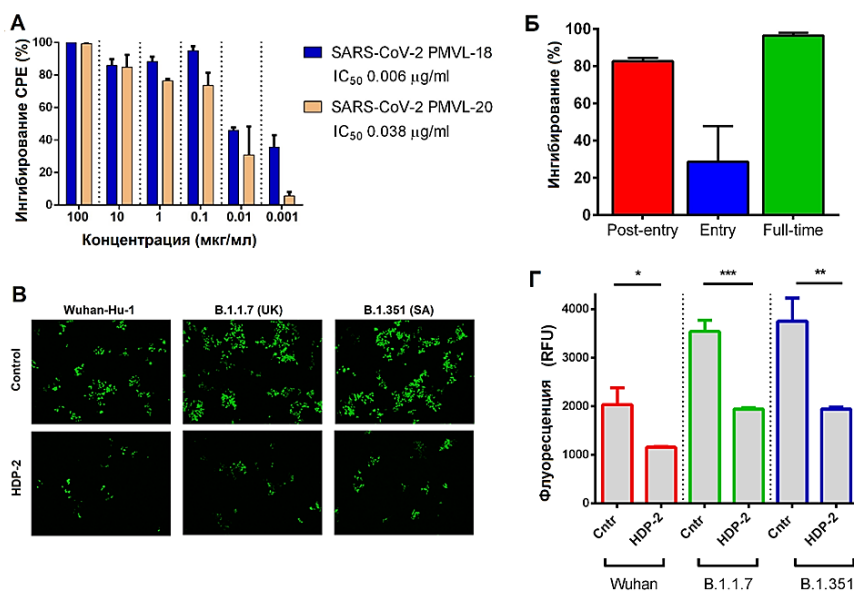
В данной части работы исследовалось восемь образцов ФЛА2 из змеиных ядов. Две ФЛА2 были получены из яда крайта *Bungarus fasciatus*: BF-PLA2-II и BF-PLA2-1. Vur-PL2 получена из яда гадюки *V. ursinii renardi*. HDP-1 и HDP-2 были получены из яда гадюки *V. nikolskii*: это димеры, состоящие из ферментативно активных субъединиц HDP-1P и HDP-2P, соответственно, в сочетании с ферментативно неактивной HDP-1I. Неактивная форма HDP-2P была также получена путем обработки HDP-2P с помощью 4-бромфенацилбромида.

Исследование ингибирования SARS-CoV-2-индуцированного цитопатического эффекта (CPE) на клетках Vero E6 использовали для анализа противовирусной активности пяти ФЛА2 из змеиных ядов. Было обнаружено, что все пять протестированных ФЛА2 обладали противовирусной активностью (Рис. 12А). Затем была изучена противовирусная активность двух субъединиц HDP-2: каталитически активная субъединица HDP-2P показала в 2 раза более высокую противовирусную активность, чем исходная HDP-2, в то время как ферментативно неактивная субъединица HDP-1I имела активность в ~ 100 раз ниже (Рис. 12Б и В). Субъединица HDP-2P inact (лишенная ферментативной активности) показала снижение противовирусной активности в 70 раз (Рис. 12Б). Интересно отметить, что арахидоновая кислота подавляла CPE, но только при высоких концентрациях (Рис. 12Г).



**Рисунок 12.** ФЛА2 из змеиногo яда обладают высокой ингибирующей активностью против цитопатического действия (CPE) SARS-CoV-2 на клетках Vero E6. А) Влияние ФЛА2 из различных ядов на CPE SARS-CoV-2. Б) Влияние HDP-2 и ее субъединиц на CPE SARS-CoV-2. В) Дозозависимые кривые для определения значений половинной максимальной ингибирующей концентрации ( $IC_{50}$ ). Г) Арахидоновая кислота слабо подавляет CPE SARS-CoV-2 на клетках Vero E6.

HDP-2 также была протестирована с использованием двух изолятов SARS-CoV-2, содержащих делеции и мутации в гликопротеине S, и продемонстрировала высокую противовирусную активность (Рис. 13А). Чтобы выяснить, на какие стадии цикла репликации SARS-CoV-2 действуют ФЛА2, клетки Vero E6 обрабатывались с помощью ФЛА2 в разные моменты заражения SARS-CoV-2, после чего уровень репликации вируса оценивали с помощью количественной ПЦР и определения вирусной нагрузки (Рис. 13Б). Анализ показал, что HDP-2 эффективно подавляла инфекцию SARS-CoV-2 на стадии «full time» и «post-entry» цикла репликации вируса, в то время как более слабое ингибирование (~ 40%) наблюдалось на стадии «entry». Кроме того, HDP-2 блокировала проникновение различных вариантов псевдовируса SARS-CoV-2, несущих ген GFP, в клетки 293T/ACE2 (Рис. 13В,Г).



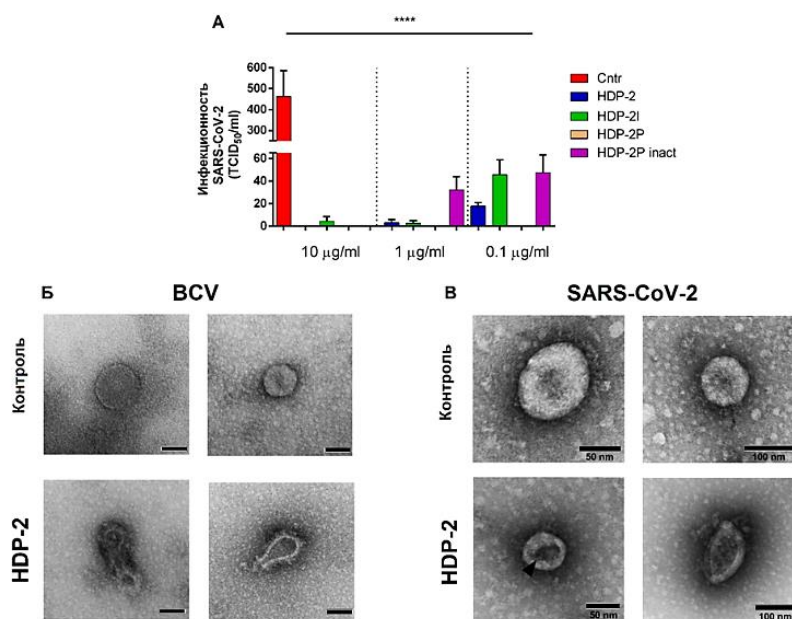
**Рисунок 13.** ФЛА2 проявляют противовирусную активность против вирусов с мутациями, и ингибируют различные стадии цикла репликации SARS-CoV-2. А) Анализ ингибирования CPE. Б) Анализ ингибирования цикла репликации SARS-CoV-2. В) 293T/ACE2 были инфицированы различными псевдо-SARS-CoV-2-GFP вирусами в присутствии буфера (контроль) или HDP-2. Репрезентативные изображения клеток 293T/ACE2, инфицированных псевдо-SARS-CoV-2.

Г) Инфекционность псевдо-SARS-CoV-2 на клетках 293T/ACE2 была количественно определена путем измерения флуоресценции GFP.

Чтобы выяснить, проявляют ли ФЛА2 свою противовирусную активность через фосфолиполитическое действие на клеточную или на вирусную мембрану, была проанализирована вирулицидная активность HDP-2 и HDP-2P, а также HDP-1I и HDP-2P inact. Полное подавление инфекционности SARS-CoV-2 наблюдалось, когда исходный вирус обрабатывали HDP-2P даже в концентрации 0,1 мкг/мл (Рис. 14А). При этой же низкой концентрации HDP-2, HDP1I и HDP-2P inact не проявляли способности полной инактивации инфекционности вируса. HDP-2P inact утрачивала вирулицидную активность при 1 мкг/мл.

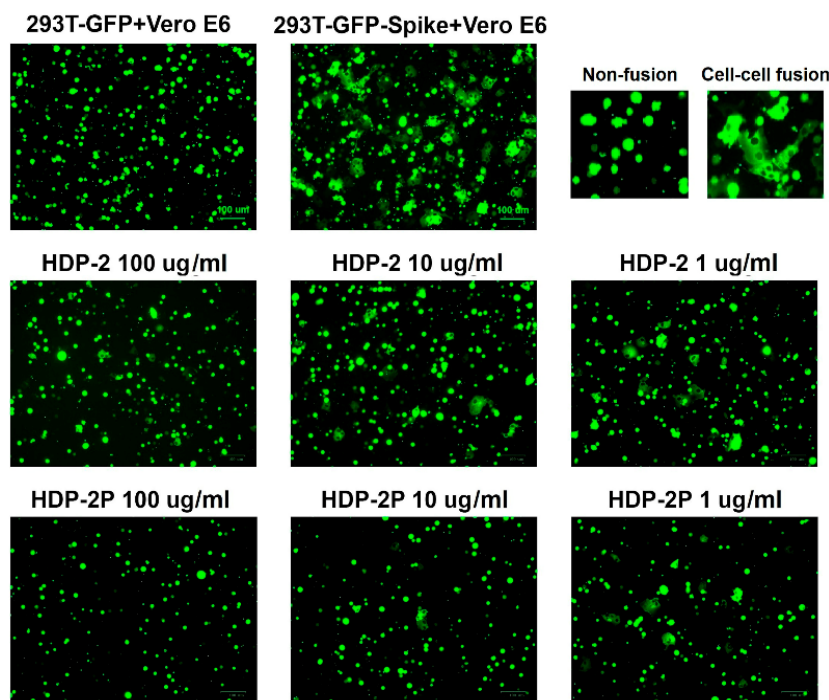
Механизм действия HDP-2 против бычьего коронавируса (BCV; прототип SARS-CoV-2) и самого SARS-CoV-2 был оценен с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Вирусная оболочка контрольного BCV, необработанного ФЛА2, была интактной, а вирионы имели преимущественно сферическую морфологию, в то время как воздействие 10 мкг/мл HDP-2 приводило к разрушению оболочки и грубому искажению ультраструктуры вируса, что отображалось значительным изменением морфологии (Рис. 14Б). Аналогичные эффекты HDP-2 наблюдались и на SARS-CoV-2 (Рис. 14В). Такие повреждения вирионов, вероятно, вызваны гидролизом липидов в вирусной мембране.





**Рисунок 14.** Димерная ФЛА2 HDP-2 и ее субъединицы HDP-2P и HDP-1I обладают высокой вирулицидной активностью, инактивируют коронавирусы и разрушают их мембрану. А) Вирулицидная активность. Б и В) С помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) было обнаружено, что HDP-2 нарушает целостность вирусной оболочки и изменяет морфологию вируса.

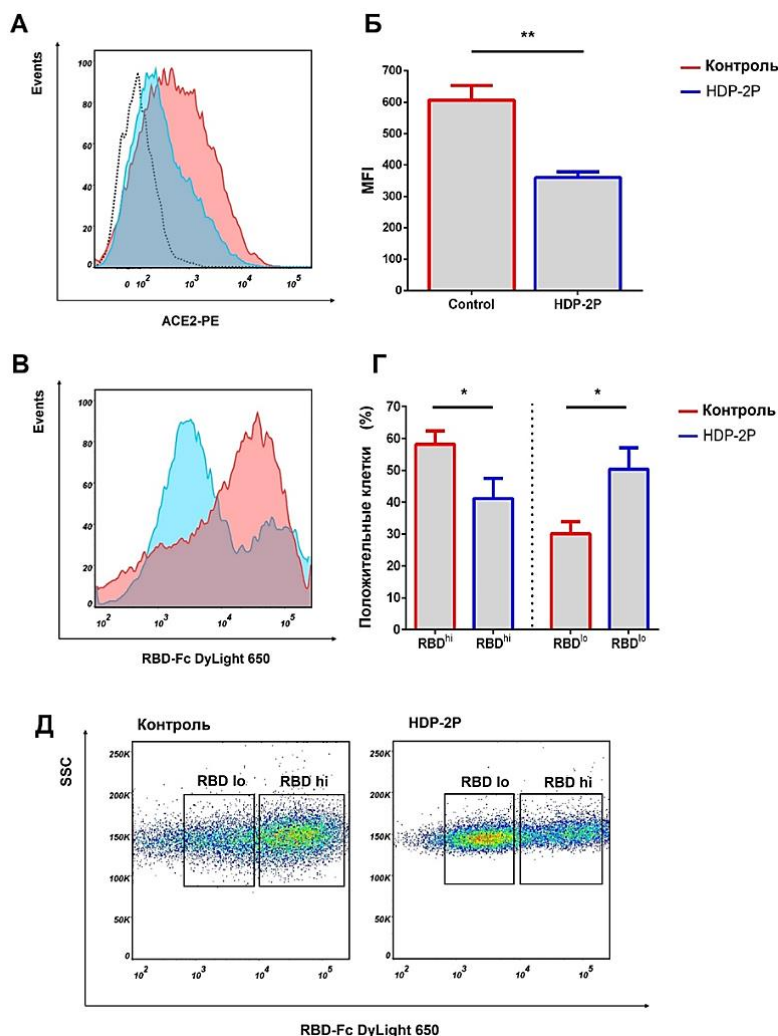
Чтобы изучить слияние клеток, вызванное взаимодействием гликопротеина S с рецептором ACE2, были использованы клетки 293Т, экспрессирующие зеленый флуоресцентный белок (GFP) и гликопротеин S SARS-CoV-2 (293Т-GFP-Spike), а также клетки Vero E6, экспрессирующие ACE2. Полученные данные (Рис. 15) показали, что HDP-1 и HDP-2 ингибируют опосредованное гликопротеином S слияние клеток на ~ 50% при концентрации 1 мкг/мл и на 70% при концентрации 100 мкг/мл (Рис. 15). HDP-2P (100 мкг/мл) полностью блокировала слияние клеток.



**Рисунок 15.** ФЛА2 ингибируют слияние клеток, вызванное гликопротеином S SARS-CoV-2. Изображения клеток, слияние которых опосредованно гликопротеином S после 2 ч инкубации в присутствии различных концентраций ФЛА2.

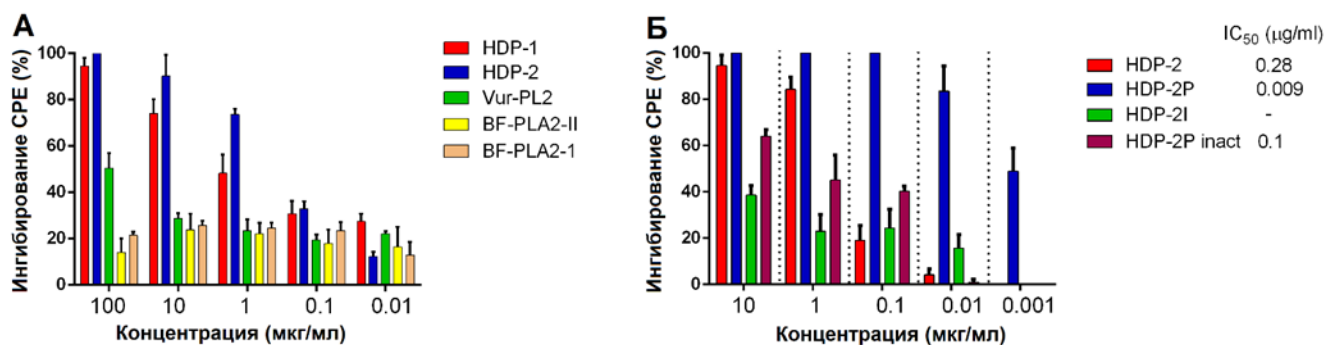
Так как каталитическая субъединица HDP-2P (при 100 мкг/мл) полностью ингибирует опосредованное гликопротеином S слияние клеток и подавляет репликацию SARS-CoV-2, взаимодействие HDP-2P с белком ACE2, основным рецептором SARS-CoV-2, представлялось

возможным. Чтобы подтвердить это предположение, было проанализировано влияние этой субъединицы на связывание ACE2-специфического антитела с клетками 293Т/ACE2 (Рис. 16 А, Б). Связывание этого антитела с ACE2 на клетках снижалось в 2 раза в присутствии HDP-2P. Далее был проанализирован ингибирующий эффект HDP-2P на связывание рецептор-связывающего домена SARS-CoV-2 (RBD) с рецептором ACE2 на клетках 293Т/ACE2 с использованием проточной цитометрии (Рис. 16 В, Г). Хотя большинство клеток в контроле были RBD<sup>hi</sup>, в популяции клеток обработанной HDP-2P, наблюдалось увеличение процента клеток RBD<sup>lo</sup> и уменьшение количества клеток RBD<sup>hi</sup>. Таким образом, обработка HDP-2P уменьшала количество RBD, связанного клеткой, что указывает на ингибирование связывания белка RBD с рецептором ACE2.



## 2.6 Исследование анти-ВИЧ активности змеиных ФЛА2.

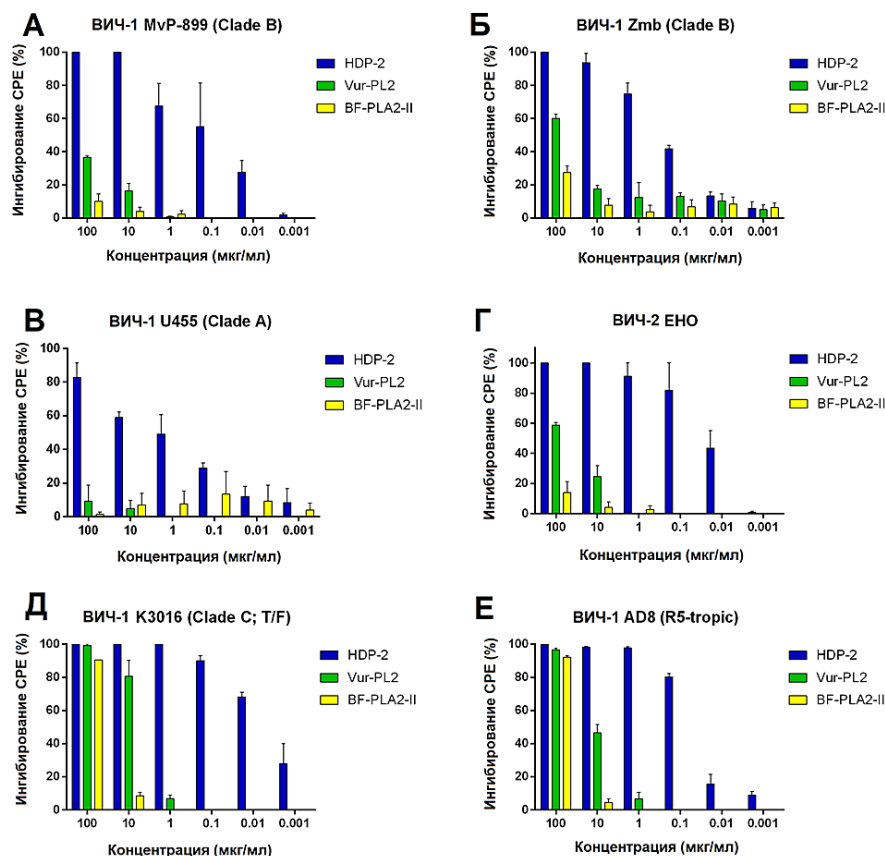
В ходе исследования, змеиные ФЛА2 представленные в предыдущем разделе, были протестированы против ВИЧ-1. Противовирусный эффект ФЛА2 оценивался в отношении референс-штамма ВИЧ-1ПВ с использованием клеток МТ-4. Мономерные ФЛА2, такие как BF-PLA2-II и BF-PLA2-1 (Рис. 17А), не проявляли активности против ВИЧ-1. ФЛА2 Vur-PL2, показала умеренную активность против ВИЧ-1. Было обнаружено, что димерные ФЛА2 HDP-1 и HDP-2 обладают наиболее высоким противовирусным эффектом (Рис. 17А и Б). Все исследованные ФЛА2 не проявили цитотоксичности в отношении клеток МТ-4 при концентрации 100 мкг/мл.



**Рисунок 17.** Противовирусная активность ФЛА2 против ВИЧ-1/ИИВ. А) Активность пяти исследованных ФЛА2 против ВИЧ-индуцированного СРЕ. Б) Противовирусная активность димерной ФЛА2 HDP-2 и ее субъединиц против ВИЧ-1.

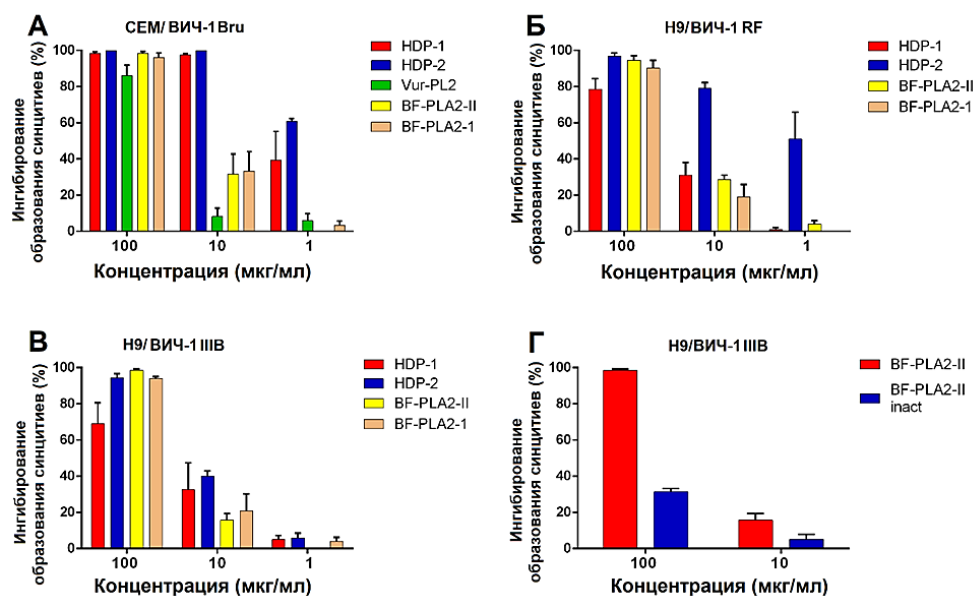
Чтобы определить, требуется ли каталитическая активность ФЛА2 для ее ингибирующего действия против ВИЧ-1, ферментативно активная субъединица HDP-2P (из димерной HDP-2), инактивированная субъединица HDP-2P inact и ферментативно неактивная субъединица HDP-2I были протестированы в модели экспериментальной ВИЧ-инфекции. HDP-2I показала слабую активность против ВИЧ-1 (Рис. 17Б). Ферментативно активная HDP-2P заметно ингибировала репликацию ВИЧ-1. Активность HDP-2P была в 30 раз выше, чем у исходной димерной ФЛА2 HDP-2. Ингибирование ферментативной активности HDP-2P (образование HDP-2P inact) привело к резкому снижению противовирусного эффекта (в 10 раз по сравнению с HDP-2P) (Рис. 17Б).

Противовирусная активность димерной ФЛА2 HDP-2, так же, как и двух мономерных Vur-PL2 и BF-PLA2-II, были протестирована с использованием панели лабораторных высокопатогенных штаммов ВИЧ-1 с различными субтипами, варианта ВИЧ-2 EHO и инфекционных молекулярных клонов (K3016 и AD8). Было обнаружено, что ФЛА2 HDP-2 активно ингибирует все варианты ВИЧ (Рис. 18). Vur-PL2 показала невысокую активность против штаммов ВИЧ-1 MvP-899, ВИЧ-1 Zmb и ВИЧ-2 EHO при максимальной концентрации, используемой в экспериментах (100 мкг/мл) (Рис. 18А, Б и Г). Тем не менее, как Vur-PL2, так и BF-PLA2-II, были способны практически полностью ингибировать репликацию инфекционных молекулярных клонов K3016 и AD8 (Рис. 18Д, Е).



**Рисунок 18.** Противовирусная активность различных ФЛА2 в отношении лабораторных штаммов ВИЧ и инфекционных молекулярных клонов. А-Г) К клеткам MT-4 добавляли разведения ФЛА2, после чего производили их заражение соответствующим штаммом ВИЧ. Ингибирование CPE определяли спустя 48-72 ч инфекции с помощью МТТ метода. Д-Е) Ингибирование репликации инфекционных молекулярных клонов с использованием ФЛА2 определяли на клетках TZM-bl по активности репортерного гена  $\beta$ -Gal.

Механизм действия ФЛА2 исследовался в отношении синцитиеобразования. Хронически ВИЧ-1 инфицированные клетки H9/ВИЧ-1ПВ, H9/ВИЧ-1RF и СЕМ/ВИЧ-1Vcu использовались в качестве клеток-индукторов для образования синцитиев. В качестве клеток-мишеней использовали неинфицированные CD4<sup>+</sup> клетки Sup-T1. Из всех протестированных ФЛА2, только димерные HDP-1 и HDP-2 показали высокую активность. Vur-PL2 показала активность в блокировании образования синцитиев с использованием клеток СЕМ/ВИЧ-1Vcu (Рис. 19А). Для других систем с хронически инфицированными ВИЧ-1 клетками активности не наблюдалось. ФЛА2 BF-PLA2-II и BF-PLA2-1 показали высокую активность при 100 мкг/мл для всех клеточных систем (Рис. 19А-В). Однако, ингибирование ферментативной активности BF-PLA2-II (inact) привело к снижению ингибирования образования синцитиев с использованием клеток H9/ВИЧ-1ПВ (Рис. 19Г).

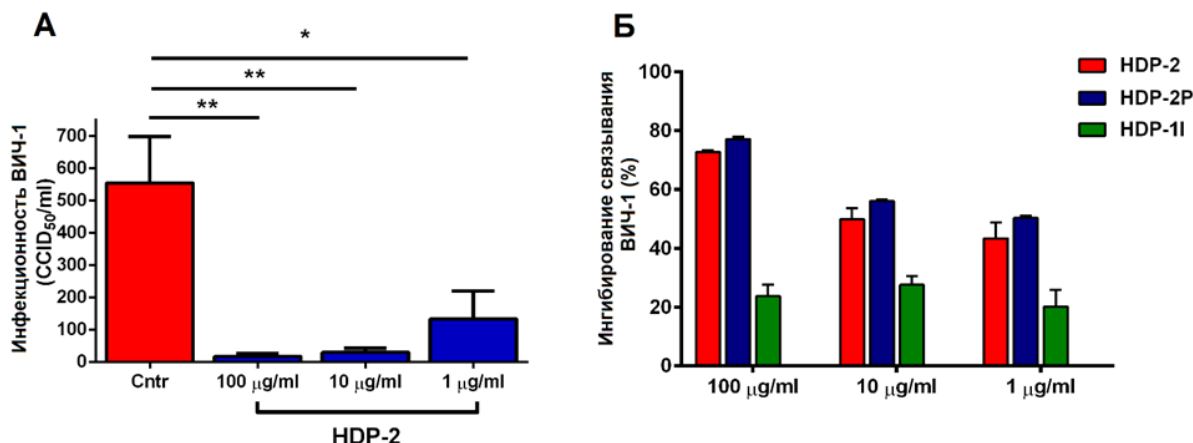


**Рисунок 19.** Влияние ФЛА2 на образование синцитиев. Клетки *Sir-T1* и клетки, хронически инфицированные ВИЧ-1, смешивали и обрабатывали ФЛА2 или буфером (контроль). Показано ингибирование образования синцитиев с помощью ФЛА2 с использованием клеток А) СЕМ/ВИЧ-1Bru, Б) Н9/ВИЧ-1RF, В) Н9/ВИЧ-1IIIВ

и Г) Н9/ВИЧ-1IIIВ с ферментативно активной и неактивной BF-PLA2-II.

Прямая вирулицидная активность димерной HDP-2 была оценена против инфекционности ВИЧ-1. Результаты показали, что HDP-2 эффективно дозозависимо нейтрализует инфекционность ВИЧ-1 (Рис. 20А). Значительное ингибирование инфекционности ВИЧ-1 наблюдалось при обработке вируса 100 и 10 мкг/мл HDP-2.

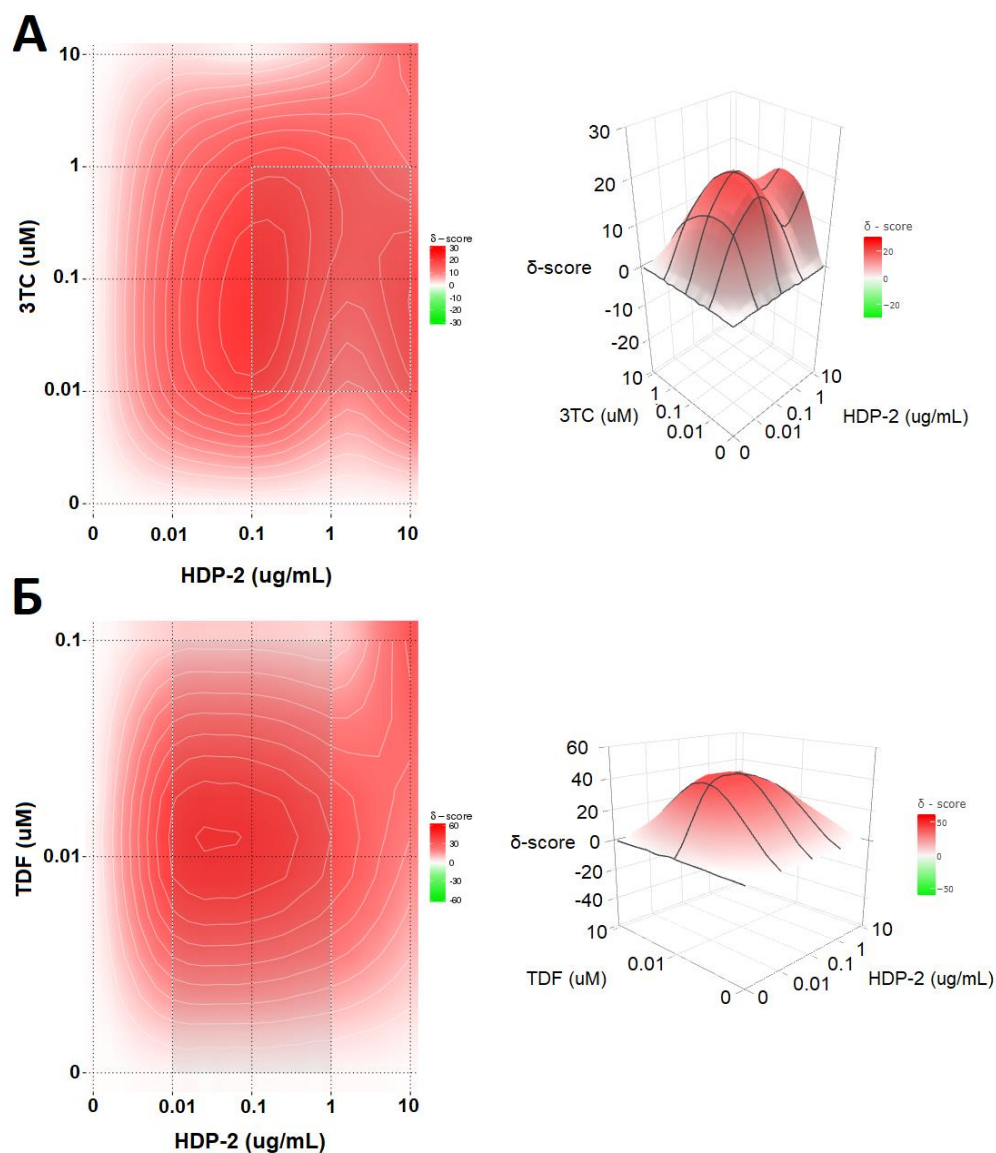
Кроме того, активность HDP-2 и ее субъединиц против ВИЧ-1 анализировалась с помощью анализа вирусной адсорбции. Ферментативно неактивная субъединица HDP-1I показала слабую активность в ингибировании адсорбции ВИЧ-1. Однако HDP-2, а также ее каталитическая субъединица HDP-2P, в равной степени значительно блокировали связывание вируса с клетками (Рис. 20Б).



**Рисунок 20.** Механизмы противовирусной активности димерной ФЛА2 HDP-2. А) Сток ВИЧ-1 обрабатывали различными концентрациями HDP-2, а затем использовали для заражения клеток МТ-4. Б) Ингибирующее действие HDP-2 и ее субъединиц на связывание ВИЧ-1IIIВ с клетками МТ-4.

В ходе работы были проведены исследования по оценке ингибирования ВИЧ-инфекции комбинациями ФЛА2 HDP-2 с Ламивудином (ЗТС) или Тенофовиром (ТДФ). Полученные данные показали, что комбинации HDP-2/ЗТС и HDP-2/ТДФ подавляли ВИЧ-опосредованный СРЕ с баллами синергии 12,9 и 24,5, соответственно (Рис. 21). Таким образом, две исследуемые

комбинации лекарственных средств с ФЛА2, продемонстрировали выраженный синергизм с более высоким показателем синергии для комбинации HDP-2/TDF.



**Рисунок 21.** Комбинации HDP-2 с А) 3ТС или Б) TDF ингибируют ВИЧ-опосредованный CPE в клетках MT-4. Ландшафты взаимодействия лекарственных препаратов и HDP-2, полученные концентрационно-матричным методом. Показаны синергидные распределения и трехмерные синергидные ландшафты.

Таким образом, полученные в этой работе данные показывают, что димерные ФЛА2 с высокой эффективностью ингибируют репликацию ВИЧ и SARS-CoV-2, и могут быть хорошими кандидатами для разработки новых противовирусных препаратов широкого спектра действия.

### 3 Выводы

1. Функциональная активность никотиновых холинорецепторов на первичных макрофагах человека и модельных клетках ТНР-1 впервые исследована с помощью комплекса методов – ПЦР, иммуоцитохимии, кальциевого имиджинга и электрофизиологии.
2. С помощью  $\alpha$ -бунгаротоксина и его флуоресцентного аналога проведена дифференциальная оценка экспрессии  $\alpha 7$  холинорецепторов на макрофагах.
3. 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  $\alpha$ -бунгаротоксин отменял эти эффекты
4. Установлено, что никотин и ацетилхолин, классические лиганды никотиновых холинорецепторов, не влияют на функциональную активность P2X7 рецепторов в тучных клетках и макрофагах.
5. 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.
6. Установлено, что ряд змеиных фосфолипаз A2 обладают выраженным противовирусным эффектом в отношении SARS-CoV-2, вызывая изменение морфологии вирионов, их инактивацию и ингибирование слияния клеток, опосредуемого S гликопротеином SARS-CoV-2. Механизмы антивирусной активности включают разрушение липидной оболочки вируса и нарушение взаимодействий с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2) и рецептор-связывающим доменом гликопротеина S (RBD).
7. Обнаружен широкий спектр антивирусной активности змеиных фосфолипаз A2 против ВИЧ и установлено, что димерная фосфолипаза A2 HDP-2 эффективно ингибировала различные высокопатогенные штаммы и псевдовirusы ВИЧ-1.

#### 4 Список работ, опубликованных по теме диссертации

##### Статьи:

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. 23(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. Kruglova N., **Siniavin A.**, Gushchin V., Mazurov D. Different Neutralization Sensitivity of SARS-CoV-2 Cell-to-Cell and Cell-Free Modes of Infection to Convalescent Sera. *Viruses*. 2021. 13(6): 1133. DOI: 10.3390/v13061133.
4. 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.
5. **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.
6. Thien V Tran, **Andrei E Siniavin**, Anh N Hoang, My T T Le, Chuong D Pham, Trung V Phung, Khoa C Nguyen, Rustam H Ziganshin, Victor I Tsetlin, Ching-Feng Weng, Yuri N Utkin. Phospholipase A2 from krait *Bungarus fasciatus* venom induces human cancer cell death in vitro. *PeerJ*. 2019. 7:e8055. doi: 10.7717/peerj.8055.
7. E. Karamov, K. Epremyan, **A. Siniavin**, Y. Zhernov, M. T. Cuevas, E. Delgado, M. Sanchez-Martinez, C. Carrera, G. Kornilaeva, A. Turgiev, J. Bacque, L. Perez-Alvarez, and Michael M. Thomson. HIV-1 Genetic Diversity in Recently Diagnosed Infections in Moscow: Predominance of AFSU, Frequent Branching in Clusters, and Circulation of the Iberian Subtype G Variant. *AIDS Res Hum Retrov*. 2018. 34(7): 629-634. doi: 10.1089/AID.2018.0055.

##### Тезисы:

1. **Andrei E. Siniavin**, Svetlana D. Grinkina, Maria A. Nikiforova, Vladimir A. Gushchin, Alexey V. Osipov, Victor I. Tsetlin and Yuri N. Utkin. Snake phospholipases A2 have high antiviral activity against HIV-1 and SARS-CoV-2 by inactivating the viruses and blocking cell-cell fusion. IAS COVID-19. 2021.
2. **AE Siniavin**, MA Streltsova, DS Kudryavtsev, V Tsetlin. A7 nicotine acetylcholine receptor (nAChR) agonists strongly activate classical macrophages and increase the expression of HLA-DR molecules. *Allergy*. 2019. 74(S106): 138.
3. D. F. Nurkhametova, K.S. Koroleva, **A. E. Siniavin**, V. I. Tsetlin, R. G. Giniatullin The role of acetylcholine in P2X7-gated mast cells activation. 2018. *J Bioenerg Biomembr*. <https://doi.org/10.1007/s10863-018-9775-7>