

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертационную работу Синявина Андрея Эдуардовича

« α -Нейротоксины и фосфолипазы A2 змеиных ядов в исследовании процессов репродукции вирусов и патогенеза воспаления», представленную на соискание степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия.

Актуальность исследования

Диссертационная работа Синявина А.Э. посвящена изучению функциональной активности и биологической роли $\alpha 7$ никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nAChR) в патогенезе сепсис-индуцированной иммуносупрессии, а также противовирусных эффектов лигандов nAChR – змеиных фосфолипаз A2 (ФЛА2). Иммунный ответ при сепсисе характеризуется гипервоспалением с последующей иммуносупрессией. Решающая роль макрофагов хорошо известна для обеих стадий сепсиса, поскольку они участвуют в иммунном гомеостазе и воспалении, а их дисфункция приводит к иммуносупрессии. Холинергический противовоспалительный путь, опосредованный макрофагальным $\alpha 7$ nAChR, представляет собой фармакологическую мишень для разработки новых лекарственных препаратов. Хотя активация $\alpha 7$ nAChR на макрофагах снижает продукцию провоспалительных цитокинов, роль этих рецепторов в иммунологических изменениях на клеточном уровне до сих пор до конца не изучена. С другой стороны, белки змеиного яда (α -нейротоксины, ФЛА2 и другие) служат точными инструментами в исследованиях nAChR, а также проявляют и другие виды биологической активности, в том числе противовирусную. Исследования антивирусной активности и механизмов действия змеиных токсинов в отношении социально-значимых, а также пандемических вариантов вирусов, представляет несомненный потенциал для разработки новых эффективных противовирусных препаратов. Таким образом, диссертационная работа Синявина А.Э. является безусловно актуальной и вносит существенный вклад в данных направлениях исследований.

Структура и объем диссертации

Диссертация Синявина А.Э. построена по традиционной схеме и состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы» и «Список цитируемой литературы». Работа изложена на 181 странице, включает 41 рисунок и 2 таблицы. Список цитируемой литературы включает

285 ссылок. Диссертационная работа носит полноценный и завершенный характер. В автореферате приведена информация об апробации работы на международных конференциях, а также список из 7 статей по теме работы, опубликованных в международных высокорейтинговых журналах.

«Обзор литературы» охватывает как структурные особенности nAХР и ФЛА2, так и биологические активности данных объектов исследования. Подробно описана экспрессия nAХР на различных типах иммунных клеток, биологические эффекты *in vitro* и *in vivo* при их активации, а также представлена информация о механизмах действия ФЛА2 и их фармакологическом потенциале.

Глава «Материалы и методы» подробно описывает очень широкий набор методов. Автор демонстрирует использование большого арсенала современных методов молекулярной и клеточной биологии, биохимии и вирусологии: стандартная кПЦР, кальциевый имиджинг одиночных клеток, электрофизиология, трансфекция клеток, флуоресцентная микроскопия, клонирование, проточная цитометрия, получение различных псевдовирусов. Отдельного внимания заслуживают вирусологические методы исследования. Методический уровень заслуживает высокой оценки.

Основные результаты работы

На первом этапе работы детально исследована функциональная активность $\alpha 7$ -рецепторов на макрофагах. Впервые, с помощью кальциевого имиджинга и электрофизиологии показана ионотропная активность $\alpha 7$ nAХР на первичных человеческих макрофагах, а также на макрофагах, полученных из моноцитарной линии THP-1. С использованием селективного агониста $\alpha 7$ -рецепторов, такого как PNU 282987, впервые установлено, что активация данного типа рецепторов на макрофагах приводит к регуляции экспрессии целого ряда макрофагальных мембранных белков, таких как HLA-DR, CD14, CD11b и CD54, играющих ключевую роль в иммуносупрессивных состояниях. С помощью α -бунгаротоксина, антагониста $\alpha 7$ nAХР, подтвержден $\alpha 7$ -опосредованный путь активации/ингибирования экспрессии макрофагальных маркеров. Кроме этого, показано влияние активации $\alpha 7$ nAХР на продукцию цитокинов в LPS-стимулированных макрофагах, где обнаружено ингибирование продукции IL-10. В продолжении темы изучения Холинергического противовоспалительного пути и АТФ-зависимого ингибирования продукции IL-1 β , Синявин А.Э. исследовал влияние холинергических агонистов на функциональную активность P2X7 рецепторов в мышечных тучных клетках и макрофагах. Изменений активности P2X7 рецепторов под действием данных лигандов обнаружено не было, в результате чего Синявин А.Э. делает заключение об отсутствии

перекрёстных лиганд-рецепторных взаимодействий между $\alpha 7$ nAХР и P2X7 рецепторами. Таким образом, автору удалось внести не только фундаментальный вклад в изучение аспектов функциональной экспрессии $\alpha 7$ -рецепторов, но и открыть новый биологический эффект активации $\alpha 7$ nAХР и регуляции мембранных макрофагальных белков и цитокинов, что может стать новой потенциальной терапевтической стратегией для предотвращения развития иммуносупрессии при сепсисе.

Вторая часть работы посвящена исследованиям цитотоксической и антивирусной активности различных змеиных ФЛА2. С использованием яда крайта *Bungarus fasciatus* обнаружены белки, способные ингибировать рост нескольких аденокарцином *in vitro*. При дальнейшем физико-химическом анализе в работе установлено, что цитотоксическим действием обладала ФЛА2, содержащаяся в яде крайта. При изучении механизмов цитотоксического действия автор установил, что ФЛА2 приводит к ингибированию маркера пролиферации Ki-67 и индуцированному апоптозу/некрозу.

Большая часть диссертационной работы посвящена изучению антивирусного действия различных змеиных ФЛА2 против ВИЧ и возбудителя COVID-19 – SARS-CoV-2. Подробно изучен противовирусный эффект пяти змеиных ФЛА2 с использованием вирус-клеточных систем, включающих как лабораторные штаммы вирусов, так и различные псевдовirusы, конструкции для которых были созданы автором. В работе Синявин А.Э. установил, что наиболее высокий противовирусный эффект показали димерные ФЛА2, полученные из гадюки Никольского, и относящиеся к группе IIА. Далее было установлено, что антивирусный эффект ФЛА2 против ВИЧ и SARS-CoV-2 зависит от фосфолипидной активности исследуемых змеиных белков. При изучении механизмов действия с помощью трансмиссионной электронной микроскопии показано разрушительное влияние ФЛА2 на вирионы SARS-CoV-2, что также подтверждает экспериментальные данные по вирулицидной активности. Кроме этого, автор открыл второй механизм антивирусного эффекта ФЛА2 против SARS-CoV-2, заключающийся в способности каталитически активной субъединицы HDP-2P (входящей в состав димерной ФЛА2 HDP-2) связываться с ACE2 рецептором, что приводит к блокированию проникновения вируса в клетку. С помощью молекулярного моделирования показаны возможные участки взаимодействий между исследуемой ФЛА2 и рецептор-связывающим доменом SARS-CoV-2. Таким образом, проделанная работа имеет как теоретическую, так и практическую значимость. Полученные результаты, главные из которых это политаргетный противовирусный механизм действия и высокая активность ФЛА2, может в дальнейшем рассматриваться как основа для создания противовирусных препаратов против особоопасных инфекций.

Достоверность и обоснованность сделанных выводов

Все заключения и выводы достоверны, корректно сформулированы и обоснованы, новы и полностью отражают полученные результаты. Прделан внушительный объем работы, исследование проведено на высоком методологическом уровне на стыке биохимии и вирусологии.

Замечания и вопросы к работе

1) В диссертационной работе подробно изучена функциональная активность альфа 7 nAХР 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 nAХР ($\alpha 2$, $\alpha 4$, $\beta 3$, $\beta 4$) со сходными с альфа 7 nAХР уровнями экспрессии, к тому же наблюдались клеточные кальциевые ответы макрофагов при добавлении неселективных агонистов nAХР. Оценивался ли в работе вклад гетеромерных nAХР в изучаемые реакции макрофагов или это планируется проводить в последующих исследованиях?

2) Данные, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, доказывают функционирование альфа 7 nAХР 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 nAХР макрофагов человека использовались его селективные лиганды: агонист PNU282987 и позитивный модулятор PNU120596. Однако в работе по исследованию влияния агонистов nAХР 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?

Заключение

Вместе с тем следует сказать, что перечисленные замечания не умаляют значимости диссертационной работы. Актуальность и новизна полученных результатов позволяют сделать заключение о том, что диссертационная работа Синявина Андрея Эдуардовича « α -Нейротоксины и фосфолипазы А2 змеиных ядов в исследовании процессов репродукции вирусов и патогенеза воспаления» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, которая полностью соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539), 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»

д.х.н., член-корр. РАН

Костров Сергей Викторович

Подпись д.х.н. Кострова С.В. заверяю:

Ученый секретарь ФГБН НИЦ «Курчатовский институт» – ИМГ

к.б.н.,



Андреева Людмила Евгеньевна

ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт» – Институт молекулярной генетики»

123182, Москва,

площадь академика И.В. Курчатова, д. 2

Тел. (499) 196-00-00. E-mail: kostrov@img.ras.ru

«27» мая 2022 г.