

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

В диссертационной работе Синявина А.Э. можно выделить два основных направления: изучение функциональной активности и биологической роли $\alpha 7$ никотиновых ацетилхолиновых рецепторов ($\alpha 7$ nAChR) макрофагов человека в патогенезе сепсиса и иммуносупрессии и исследование цитотоксической активности ряда фосфолипаз A2 из змеиного яда в отношении раковых клеток и их антивирусной активности. Известно, что избыточная продукция провоспалительных цитокинов может приводить к самым неблагоприятным для организма последствиям, вызывая нарушения функций и повреждения различных органов. Холинергический противовоспалительный путь, связывающий нервную и иммунную систему, может подавлять избыточный цитокиновый ответ и защищать организм от повреждений. $\alpha 7$ nAChR является важным компонентом холинергического противовоспалительного пути, поскольку его активация снижает высвобождение провоспалительных цитокинов. В диссертационной работе Синявина А.Э. впервые детально исследована активация макрофагальных $\alpha 7$ nAChR на клеточном уровне и показано ее влияние на экспрессию некоторых важных мембранных белков и цитокинов. Учитывая, что фосфолипазы A2 (ФЛА2) из яда некоторых змей могут взаимодействовать с $\alpha 7$ nAChR, логично было исследовать ранее мало изученные активности этих ферментов, в частности их антивирусную активность и влияние на пролиферацию опухолевых клеток. Оба направления исследований в работе Синявина А.Э. имеют четко выраженную терапевтическую направленность, что во многом определяет актуальность проведенных диссертантом 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. Содержание диссертации полностью соответствует

специальности. Результаты работы представлены в 7 статьях, опубликованных в международных высокорейтинговых журналах. В автореферате приводится также информация об апробации работы на международных конференциях. Публикации по итогам работы и автореферат в полной мере отражают основное содержание диссертации.

Общая характеристика содержания диссертационной работы

Во введении очень четко и конкретно описаны актуальность исследования, его научная новизна, практическая ценность, а также цель и задачи диссертационной работы. Обзор данных литературы состоит из двух разделов, тесно связанных с тематикой всей работы. В первом разделе представлены данные по структуре $\alpha 7$ nAХР и роли этих рецепторов в холинергическом противовоспалительном пути. Второй раздел посвящен описанию суперсемейства фосфолипаз А2 и возможности их терапевтического использования, в том числе как противовирусных агентов. Обзор написан хорошим литературным языком, с интересом читается и помогает читателю лучше понять выбор направления исследований и значимость проделанной диссертантом работы.

В разделе «Материалы и Методы» четко и подробно описаны многочисленные методики, использованные в работе. Необходимо сразу отметить, что диссертант использовал широкий спектр самых современных методов молекулярной и клеточной биологии и вирусологии: ПЦР, кальциевый имиджинг одиночных клеток, иммуоцитохимию, электрофизиологию, различные варианты трансфекции клеток, флуоресцентную микроскопию, проточную цитометрию, генетическую инженерию. Особо следует отметить высокий уровень работы с такими опасными вирусами, как ВИЧ-1 и SARS-CoV-2.

Разделы «Результаты» и «Обсуждение» по объему представляют собой половину всей диссертации. Раздел «Результаты» логично состоит из двух больших подразделов, в первом из которых описывается работа по исследованию функциональной активности $\alpha 7$ nAХР макрофагов. Впервые с использованием большого набора методов показано, что экспрессия функционального рецептора $\alpha 7$ -типа в макрофагах повышена по сравнению с другими подтипами никотинового ацетилхолинового рецептора. Кроме того, Синявиным А.Э. впервые продемонстрирована потенциальная роль $\alpha 7$ nAХР в подавлении иммуносупрессии, которая развивается в процессе воспаления, за счет регуляции мембранных макрофагальных белков и продукции цитокинов. Так, активация макрофагального $\alpha 7$ nAХР 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. Это очень важные результаты, поскольку известно, что именно такие изменения экспрессии этих факторов уменьшают воспаление при сепсисе. Соответственно, направленная активации $\alpha 7$ nAХР может стать новой потенциальной стратегией при лечении пациентов с сепсис-опосредованной иммуносупрессией.

Во втором подразделе приведены результаты, полученные при исследовании цитотоксической и антивирусной активности различных змеиных ФЛА2. Цитотоксичность в отношении клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 и аденокарциномы легкого A549 проверялась для ФЛА2, выделенной из яда крайта *Bungarus fasciatus*. Было установлено, что ФЛА2 проявляет зависящую от времени цитотоксичность для клеток MCF-7 и A549, но не влияет на доброкачественные клетки НК2. Молекулярный механизм действия ФЛА2 был подробно изучен с помощью проточной цитометрии, которая показала, что обработка раковых клеток ФЛА2 приводит к снижению экспрессии маркера пролиферации Ki-67, а также к увеличению числа апоптотических клеток. Все эти данные указывают на антипролиферативный эффект изученной ФЛА2 и апоптотический путь клеточной гибели. Помимо этого, тот факт, что исследуемая ФЛА2 не проявляла цитотоксичности по отношению к нераковым клеткам НК2, позволил диссертанту предположить, что цитотоксичность не связана напрямую с ферментативной активностью. Это очень интересное предположение, которое требует, однако, тщательной проверки.

Повышенное внимание в своей работе Синявин А.Э. обратил на исследование антивирусного действия пяти ФЛА2 из змеиных ядов. Так, для всех этих препаратов было обнаружено ингибирование цитопатического эффекта на клетках Vero E6, индуцированного SARS-CoV-2, причем наибольшую активность проявляли димерные ФЛА2 (HDP-1 и HDP-2) из яда гадюки *V. Nikolskii*. Эти димеры состоят из ферментативно активных субъединиц HDP-1P и HDP-2P, соответственно, в сочетании с ферментативно неактивной субъединицей HDP-1I. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии Синявин А.Э. показал, что обработка вируса ФЛА2 HDP-2 приводит к разрушению оболочки и значительным изменением морфологии вируса, вероятно, вызванным гидролизом липидов в вирусной мембране. Однако, помимо этого оказалось, что каталитическая субъединица HDP-2P полностью ингибирует взаимодействие вирусного гликопротеина S с клеточным белком ACE2, который является основным рецептором SARS-CoV-2. Таким образом, впервые был предложен двойной механизм ингибирования репликации SARS-CoV-2 с помощью ФЛА2 HDP-2: за счет гидролиза

липидов в мембране вируса и за счет ингибирования связывания вирусного гликопротеина S с клеточным рецептором ACE2.

Вторым вирусом, изученным в работе, был вирус иммунодефицита человека. Оказалось, что димерные ФЛА2 HDP-1 и HDP-2, наиболее активные против SARS-CoV-2, проявляют высокую противовирусную активность и против ряда высокопатогенных штаммов ВИЧ-1, а также ВИЧ-2 и инфекционных молекулярных клонов. Интересно, что изучаемые ФЛА2 проявили различную ингибирующую способность по отношению к разным подтипам ВИЧ-1: суб-субтип А6 эффективно подавлялся, в то время как для рекомбинантной формы CRF02_AG/A6 наблюдалось значительное снижение противовирусной активности. Диссертант логично предположил, что такие различия могут быть связаны с особенностями строения вирусной мембраны. Димерные HDP-1 и HDP-2 показали высокую активность в блокировании образования синцитиев в результате слияния ВИЧ-инфицированных клеток с неинфицированными CD4+-клетками. Кроме того, активность HDP-2 и ее субъединиц против ВИЧ-1 анализировалась с помощью анализа вирусной адсорбции. Синявин А.Э. показал, что HDP-2 блокирует связывание вируса с клетками, причем для этого оказалась необходима фосфолипазная активность, поскольку ферментативно неактивная субъединица HDP-1I оказалась практически неспособна ингибировать адсорбцию ВИЧ-1, а эффективность блокирования адсорбции каталитической субъединицей HDP-2P оказалась сравнима с эффективностью действия димерной фосфолипазы. Таким образом, в работе не только показана противовирусная активность димерных ФЛА2, но и проведены серьезные исследования механизма их ингибирующего действия. Полученные результаты, несомненно, могут в дальнейшем рассматриваться как основа для создания новых противовирусных препаратов.

Необходимо подчеркнуть, что все указанные выше результаты являются оригинальными и ярко отражают новизну данной работы. Работа Синявина А.Э. представляет собой целостное и завершенное научное исследование, выполненное на очень высоком экспериментальном уровне. Результаты работы изложены чётко и ясно. Сделанные выводы обоснованы и подтверждаются полученными экспериментальными данными. Хочется также отметить высокое качество не только экспериментальной работы диссертанта, но и подготовки диссертации. Вся работа очень хорошо структурирована, снабжена четкими и аккуратными рисунками. В работе мало стилистических и грамматических ошибок и опечаток.

Замечания и вопросы к работе

Тем не менее, интерпретация некоторых результатов и некоторые выводы вызывают вопросы. 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.

Второй вопрос касается исследования механизма ингибирования репликации SARS-CoV-2. В работе указывается, что противовирусное 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 противовирусного 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 противовирусный эффект не может быть объяснен только нарушением вирусной мембраны или блокированием связывания гликопротеина S с рецептором ACE2.

Заключение

Вместе с тем, указанные недочеты никоим образом не умаляют значимости диссертационного исследования и не снижают общего высокого уровня работы, которая, несомненно, является высококлассным научным исследованием. Актуальность и новизна полученных результатов позволяют сделать заключение о том, что диссертационная работа Синявина Андрея Эдуардовича « α -Нейротоксины и фосфолипазы A2 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

заведующий отделом химии нуклеиновых кислот
научно-исследовательского института
физико-химической биологии
имени А.Н.Белозерского
Московского государственного университета
имени М.В.Ломоносова
д.х.н., профессор

 /Готтих М.Б./

Контактные данные:

телефон: +7 495 939 5407

адрес электронной почты: gottikh@belozersky.msu.ru

Адрес места работы:

119991 Москва, ул. Ленинские горы, дом 1, строение 40.

НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ

Тел.: +7 (495) 939-53-59; e-mail: fxb@genebee.msu.ru

Подпись Готтих М.Б. заверяю:

Директор НИИ физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского
МГУ имени М.В.Ломоносова
академик РАН



В.П. Скулачев/

25.05.2022