

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук

на правах рукописи

Синявин Андрей Эдуардович

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

1.4.9. – биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

научный руководитель  
д.х.н., проф., чл.-корр. РАН  
Цетлин Виктор Ионович

Москва - 2022 г

## Оглавление

Оглавление.....	2
Введение.....	6
1 Обзор литературы.....	15
1.1 Холинергический противовоспалительный путь – новый механизм регуляции иммунной системы через нейроиммунные взаимодействия.....	15
1.1.1 Ацетилхолин и воспаление.....	18
1.1.2 Структурные и функциональные аспекты $\alpha 7$ никотинового ацетилхолинового рецептора.....	19
1.1.3 Функциональная роль активации $\alpha 7$ nAChR на иммунных клетках.....	22
1.1.4 Активация $\alpha 7$ nAChR и внутриклеточные сигнальные пути.....	31
1.1.5 Возможное фармакологическое использование агонистов nAChR.....	34
1.1.6 Пуринергические рецепторы P2X7 и их роль в «Холинергическом противовоспалительном пути».....	39
1.2 Суперсемейство фосфолипаз A2 и их фармакологический потенциал.....	43
1.2.1 Основные группы фосфолипаз и механизмы цитотоксичности.....	44
1.2.2 Противовирусная активность змеиных ФЛА2.....	49
1.3 Заключение.....	54
2 Материалы и методы.....	56
2.1 Материалы.....	57

2.1.1 Клеточные линии.....	57
2.1.2 Вирусы.....	57
2.1.3 Растворы и реагенты.....	58
2.1.4 Антитела.....	59
2.1.5 Змеиные фосфолипазы A2 (ФЛА2).....	59
2.2 Методы.....	60
2.2.1 Получение макрофагов человека, их стимуляция и исследование экспрессии nAHR.....	60
2.2.2 Оценка открытия больших пор рецептора P2X7, с помощью АТФ, под действием лигандов nAHR.....	64
2.2.3 Исследование цитотоксических свойств змеиных ФЛА2.....	67
2.2.4 Исследование анти-ВИЧ и анти-SARS-CoV-2 активностей ФЛА2.....	69
3 Результаты.....	78
3.1 Исследование функциональной активности и биологической роли nAHR в макрофагах человека в норме и при воспалении <i>in vitro</i> .....	78
3.1.1 Оценка экспрессии субъединиц nAHR и функциональной активности $\alpha 7$ nAHR в макрофагах человека.....	78
3.1.2 Исследование экспрессии HLA-DR, CD11b, CD54 и CD14 при активации $\alpha 7$ -рецепторов на макрофагах с использованием PNU 282987.....	84
3.1.3 Оценка продукции TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-10 в процессе активации $\alpha 7$ nAHR с использованием PNU 282987.....	88
3.2 Изучение влияния холинергических лигандов $\alpha 7$ nAHR на функциональную активность P2X7 рецепторов.....	89

3.2.1 Исследование действия холинергических агонистов на АТФ-индуцированное поглощение YO-PRO-1 тучными клетками.....	89
3.2.2 Влияние агонистов nAХР на функциональную активность P2X7 рецепторов в макрофагах человека.....	93
3.3 Исследование цитотоксического действия ФЛА2 из яда крайта <i>Bungarus fasciatus</i> в отношении раковых клеток.....	96
3.3.1 Разделение яда и оценка цитотоксичности ФЛА2.....	96
3.3.2 Морфологические исследования клеток с использованием фазово-контрастной микроскопии.....	101
3.3.3 Оценка пролиферации и апоптоза/некроза клеток MCF-7 под действием фракции BF7.3.....	102
3.4 Исследование противовирусной активности змеиных ФЛА2 против возбудителя COVID-19 (SARS-CoV-2).....	104
3.4.1 Характеризация ФЛА2 выделенных из различных змей...	104
3.4.2 Антивирусная активность змеиных ФЛА2 против SARS-CoV-2.....	105
3.4.3 Исследование цитотоксичности ФЛА2 и их влияния на пролиферацию клеток Vero E6.....	110
3.4.4 Исследование влияния ФЛА2 на морфологию коронавирусов и их вирулицидную активность.....	112
3.4.5 Оценка влияния ФЛА2 на гликопротеин S-опосредованное слияние клеток.....	114
3.4.6 Исследование ингибирующей активности субъединицы NDP-2P на связывание anti-ACE2 антител и рецептор-связывающего домена (RBD) гликопротеина S с ACE2 рецептором.....	116

3.5	Исследование анти-ВИЧ активности змеиных ФЛА2.....	120
3.5.1	Антиретровирусная активность зминых ФЛА2 против ВИЧ дикого типа и псевдовирусов различных субтипов.....	120
3.5.2	Влияние ФЛА2 на образование синцитиев в системе сокультивации хронически-инфицированных ВИЧ-1 клеток и индикаторных клеток Sup-T1.....	124
3.5.3	Вирулицидная активность димерной ФЛА2 HDP-2 и блокирование адсорбции ВИЧ-1.....	125
3.5.4	Синергидные эффекты HDP-2 и нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ (НИОТ).....	126
4	Обсуждение.....	128
5	Выводы.....	146
6	Благодарности.....	147
6	Список литературы.....	149

## Введение

### *Актуальность темы исследования*

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 гипофизарно-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 A2 (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  $\alpha 7$  nAХР, играющих противовоспалительную роль.

### ***Цель и задачи исследования***

Как отмечено выше, работа велась по двум направлениям: целью первого являлось изучение функциональной активности и биологической роли  $\alpha 7$  nAХР на макрофагах, а также взаимосвязи nAХР с P2X7 рецепторами в контексте воспалительных процессов, включая дифференциальную оценку экспрессии  $\alpha 7$  nAХР на различных клетках с использованием такого  $\alpha$ -нейротоксина, как  $\alpha$ -бунгаротоксин. Второе направление работы было посвящено исследованию цитотоксической активности ряда змеиных фосфолипаз А2 против раковых клеток и их противовирусной активности. Основанием для этой работы служат проводимые в Отделе молекулярной нейроиммунной сигнализации исследования пептидов и белков из различных животных ядов для изучения различных подтипов nAХР. Среди них имеется богатый набор пептидных и белковых нейротоксинов, характеризующихся различиями в избирательности взаимодействия с определенными подтипами nAХР. 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 противовирусных 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 nAHR и функциональных  $\alpha 7$ -рецепторов в 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 nAHR 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 nAHR на макрофагах человека с использованием комбинации различных методов. Установлено, что в большей степени, по сравнению с другими подтипами nAHR, макрофаги экспрессируют функциональный рецептор  $\alpha 7$ -типа. Активация макрофагального  $\alpha 7$  nAHR с помощью селективного агониста PNU 282987 способствовала усилению

экспрессии мембранных белков HLA-DR, CD11b и CD54, в то время как экспрессия мембранного рецептора CD14 и продукция цитокина IL-10 снижалась. Проверена возможность взаимодействия  $\alpha 7$  nAHP и P2X7 рецепторов на мышечных тучных клетках и макрофагах человека в контексте «Холинергического противовоспалительного пути» и при этом установлено, что классические лиганды nAHP 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 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 изучена также 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 пермиссивными клетками.

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

Практическая значимость работы состоит в получении новой информации о роли  $\alpha 7$  nAHP 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. Полученные результаты и разработка 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 противовирусных средств против социально-значимых инфекций.

### *Апробация работы и публикации*

#### *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. 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. 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 докладов на конференциях***

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>

## **1 Обзор литературы**

### **1.1 Холинергический противовоспалительный путь – новый механизм регуляции иммунной системы через нейроиммунные взаимодействия**

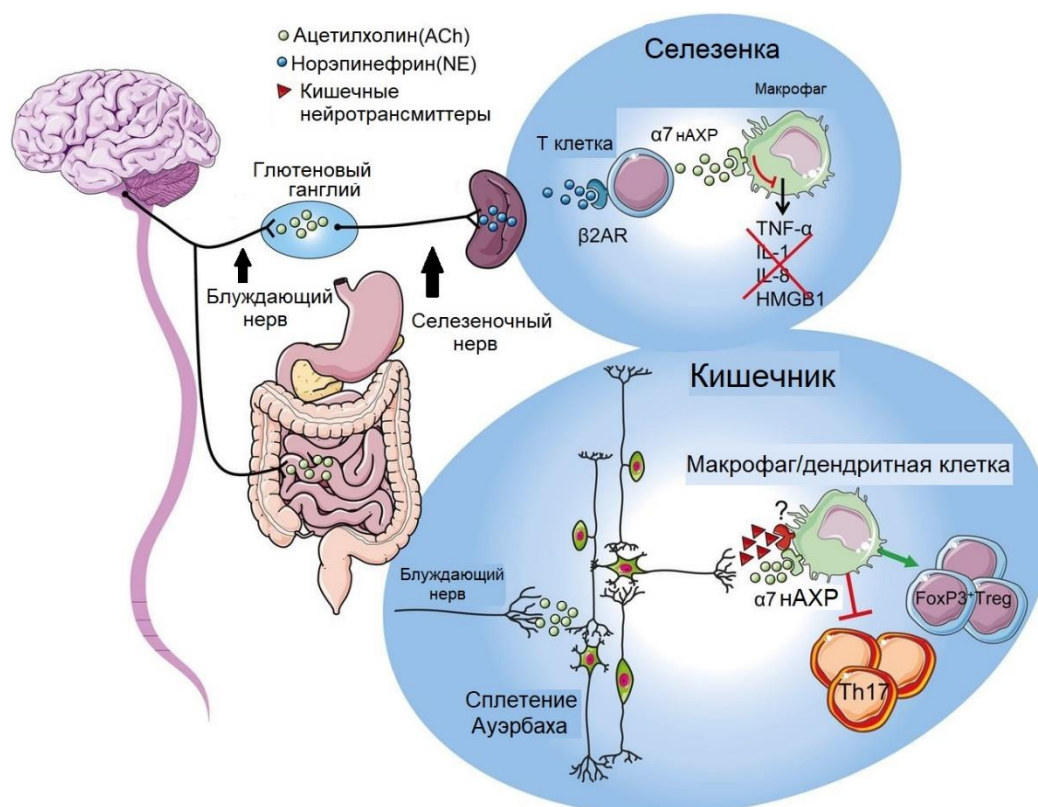
Жизнь человека невозможна без точной регуляции иммунной системы. Продукция провоспалительных цитокинов является важным физиологическим процессом для активации иммунных реакций во время регенерации тканей, заживления травм или в процессе инфекций, а также для защиты нашего тела от кровоизлияний, ишемии, рака и сепсиса. Контролируемое продуцирование провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкины (IL), фактор некроза опухоли – альфа (TNF- $\alpha$ ) и амфотерин (HMGB1), запускает полезные воспалительные реакции, которые способствуют локальной коагуляции, позволяя ограничить распространение инфекции и повреждение тканей [1]. Тем не менее, неограниченное производство этих цитокинов является более опасным, чем первоначальное повреждение организма и оказывается одной из основных причин патологий и смерти людей. Одним из наиболее ярких примеров этого процесса является «тяжелый сепсис», основная причина смерти в отделениях интенсивной терапии [2]. Тяжелый сепсис характеризуется постоянным производством провоспалительных цитокинов, которые вызывают системное воспаление, сердечно-сосудистую дисфункцию и летальную полиорганную недостаточность [3]. Его патогенез сложен и требует специального лечения. Патогенез сепсиса иллюстрируется исследованиями, показывающими, что нейтрализация провоспалительных цитокинов (моноклональные антитела против TNF и антагонисты рецептора IL-1) оказалась успешной при лечении воспалительных состояний, таких как ревматоидный артрит, болезнь Крона и псориаз [1,4,5], но не дает существенных эффектов при лечении тяжелого сепсиса [6]. Потенциальным объяснением этой загадки является то, что патогенез сепсиса не опосредован одним цитокином, и, следовательно, для

успешного лечения может потребоваться комплексная стратегия ингибирования нескольких, а не только одного воспалительного цитокина. Недавние исследования показали, что нервная система контролирует иммунную систему посредством сложного механизма, который модулирует выработку нескольких воспалительных цитокинов. Эти исследования показывают, что такой механизм может обеспечить терапевтическое преимущество для лечения сложных воспалительных заболеваний, подобных тяжелому сепсису. В соответствии с этой гипотезой недавние исследования экспериментального сепсиса показали, что стимуляция эфферентного блуждающего нерва предотвращает системное воспаление и снижает летальность [7,8]. Посредством стимуляции парасимпатической нервной системы удалось ослабить сывороточные уровни различных провоспалительных цитокинов, включая TNF- $\alpha$  и HMGB1 (белок высокой подвижности 1, амфотерин) (Рис. 1). Кроме этого, такой механизм обеспечивает большое преимущество для разработки новых фармакологических противовоспалительных стратегий.

Вагусная модуляция иммунных реакций может происходить в плотно иннервируемом желудочно-кишечном тракте. В просвете кишечника содержится огромное количество комменсальных кишечных микробов (по оценкам, от  $10^{11}$  до  $10^{12}$  на грамм стула в толстой кишке [9]), и иммунная система должна оказывать регулируемый ответ на полезные или патогенные микробы [10]. Парасимпатическая нервная система, классическая функция которой заключается в контроле частоты сердечных сокращений, секреции гормонов, перистальтики желудочно-кишечного тракта и пищеварения во время приема пищи, может также контролировать иммунные реакции на комменсальную флору и пищевые компоненты. Поступление жиров вместе с пищей, стимулирует выработку холецистокинина (ССК), который является характерным нейропептидом, высвобождаемым во время приема пищи, и необходимым для запуска нескольких функций пищеварения, включая



секрецию экзокринной части поджелудочной железы и активацию сигналов афферентного блуждающего нерва, чтобы вызвать сытость.



**Рисунок 1.** Схематическое изображение холинергического противовоспалительного пути. Во время системного воспаления центральная нервная система активируется через циркумвентрикулярные органы и афферентные нервные окончания. Далее сигнал поступает в верхний брыжеечный ганглион и модулирует иммунный ответ в селезенке. Активация адренергических нейронов в селезенке приводит к высвобождению норэпинефрина, который вызывает высвобождение ацетилхолина множеством Т-клеток. Ацетилхолин взаимодействует с  $\alpha 7$  nAChR, экспрессируемым на макрофагах, продуцирующих цитокины, уменьшая высвобождение TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-18, HMGB1 и других цитокинов. Во время воспаления кишечника, центральная нервная система активируется через блуждающий нерв. Активация кишечных нейронов индуцирует высвобождение ацетилхолина и, возможно, других иммуномодулирующих нейротрансмиттеров, что приводит к контролю кишечного воспаления и восстановлению кишечного иммунного гомеостаза [11].

Недавнее исследование показало, что ССК, высвобождаемый в результате энтерального питания с высоким содержанием жиров, ингибировал индуцированный геморрагическим шоком выброс TNF- $\alpha$  и IL-6 [12]. Этот противовоспалительный эффект ССК опосредуется блуждающим нервом, так как хирургическая или химическая ваготомия отменяла противовоспалительный эффект как при диете с высоким содержанием жиров, так и при введении ССК [12]. В соответствии с этим, активация блуждающего

нерва предотвращает вызванное хирургическими манипуляциями воспаление кишечной мускулатуры и улучшает состояние послеоперационной кишечной непроходимости [13] - типичного патологического состояния, возникающего в результате операции на брюшной полости.

Противовоспалительное действие эфферентной активности блуждающего нерва на желудочно-кишечный тракт согласуется с предыдущими исследованиями, свидетельствующими о том, что хирургическая ваготомия увеличивает подверженность грызунов системному воспалению при септическом и геморрагическом шоке [7]. Следовательно, блуждающий нерв может функционировать как физиологическая противовоспалительная система, и клинический потенциал этого механизма не обязательно ограничен желудочно-кишечным трактом. Электрическая стимуляция блуждающего нерва снижает уровни провоспалительных медиаторов, таких как TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1b и HMGB-1, в экспериментальных моделях эндотоксемии, геморрагического шока и полимикробного сепсиса. Недавние исследования показали, что селезенка играет ключевую роль в регуляции таких эффектов, так как электростимуляция блуждающего нерва не приводила к ослаблению сывороточного уровня TNF- $\alpha$  у спленэктомированных животных [14].

### **1.1.1 Ацетилхолин и воспаление**

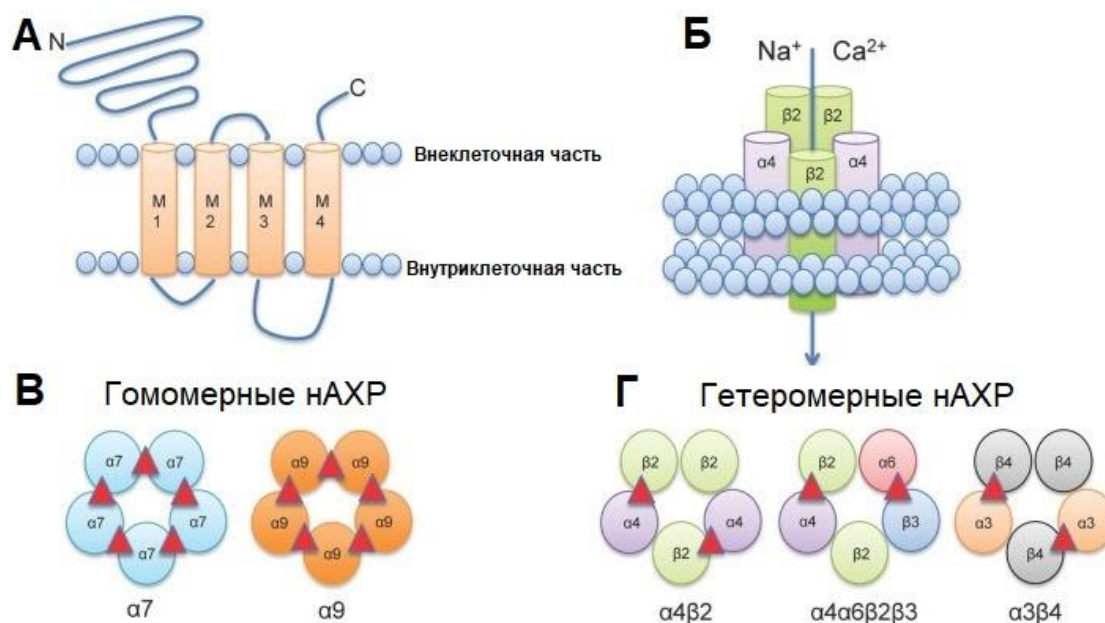
На молекулярном уровне большинство работ о противовоспалительном потенциале блуждающего нерва были основаны на эффектах ацетилхолина, основного нейротрансмиттера парасимпатической нервной системы. Ацетилхолиновые (никотиновые и/или мускариновые) рецепторы экспрессируются на различных иммунных клетках и на тех клетках, которые происходят из костного мозга (лимфоидные и миелоидные клетки). Функциональная роль рецепторов стала ясна после того, как было обнаружено, что ацетилхолин контролирует выработку провоспалительных

цитокинов в макрофагах [7]. Поскольку ацетилхолин передает сигналы через мускариновые (G-белок сопряженные) рецепторы или никотиновые (лиганд-управляемые ионные каналы) рецепторы [15], селективные холинергические агонисты и антагонисты использовались для идентификации рецепторов, участвующих в контроле активации макрофагов. Мускарин незначительно ингибировал активацию макрофагов на супрафизиологических уровнях, в то время как никотин был более эффективен, чем ацетилхолин в подавлении высвобождения провоспалительных цитокинов из макрофагов [8]. Эти эффекты были специфичны для провоспалительных цитокинов, и ни ацетилхолин, ни никотин не ингибировали выработку противовоспалительных цитокинов, таких как трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) или IL-10. Следовательно, противовоспалительное действие ацетилхолина на макрофаги, по-видимому, опосредовано через никотиновые рецепторы, и никотин является более селективным фармакологическим агонистом, контролирующим выработку провоспалительных цитокинов. Транскрипты субъединиц  $\alpha 7$ ,  $\beta 2$ , а также  $\alpha 4$  nAChR были обнаружены во множественных типах клеток, включая макрофаги, происходящих из различных тканей [7,16]. Обнаружение различных подтипов nAChR, экспрессируемых на иммунных клетках, позволяет предположить, что никотин может воздействовать на клетки по-разному, исходя из сродства к рецептору [17,18]. Тем не менее, большинство исследований указывают на решающую роль гомопентамерного  $\alpha 7$  nAChR в холинергической регуляции активности макрофагов.  $\alpha 7$  nAChR экспрессируется на макрофагах, и его экспрессия имеет решающее значение для противовоспалительного эффекта.

### **1.1.2 Структурные и функциональные аспекты $\alpha 7$ никотинового ацетилхолинового рецептора**

Нейрональные nAChR представляют собой пентамерные комплексы, состоящие из  $\alpha$ - и  $\beta$ - субъединиц (гетеромерные рецепторы) или из некоторых

$\alpha$ -субъединиц (гомомерные рецепторы), которые образуют лиганд-управляемый ионный канал. Большое количество различных субъединиц (девять  $\alpha$ - и четыре  $\beta$ -субъединиц) обеспечивает разнообразие возможных нАХР с различной физиологической функцией и сродством к лиганду (Рис. 2) [19–21].

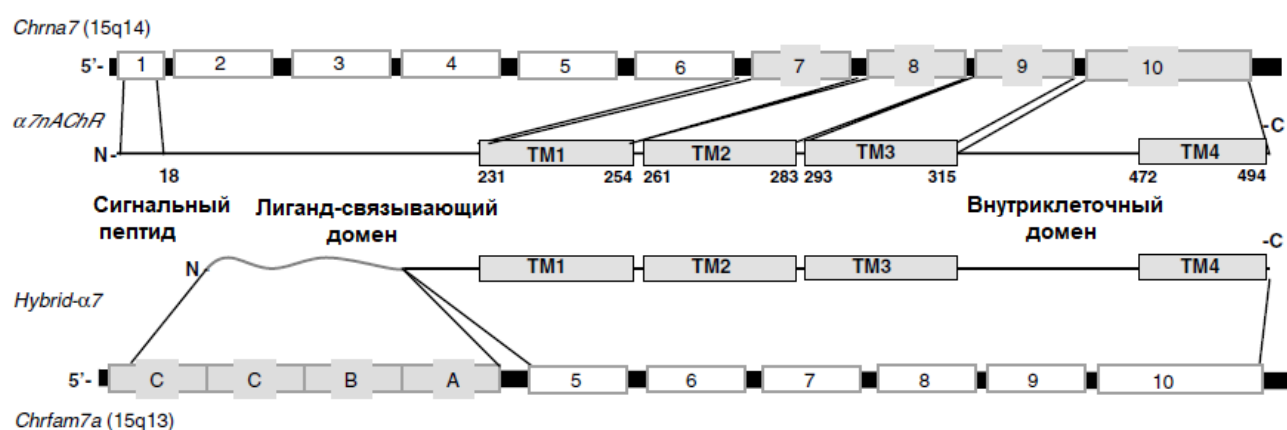


**Рисунок 2.** Структура нАХР. А) Мембранная топология нейрональной субъединицы нАХР. Каждая субъединица нАХР содержит четыре трансмембранных домена (М1-М4), внеклеточный амино- и карбокси-конец и внутриклеточную петлю М3-М4 переменной длины. Б) Пять субъединиц объединяются, чтобы сформировать функциональный рецепторный комплекс. В) Гомомерные рецепторы состоят только из  $\alpha$ -субъединиц и обычно имеют низкое сродство к агонисту. Г) Большинство высокоаффинных нАХР являются гетеромерными и состоят из комбинаций  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц. Важно, что несколько  $\alpha$ -субъединиц могут объединяться с несколькими  $\beta$ -субъединицами в пентамерном комплексе нАХР (проиллюстрировано как  $\alpha 4\alpha 6\beta 2\beta 3$ ). Сайты связывания АСh обозначены красными треугольниками [22].

$\alpha 7$  нАХР является хорошо охарактеризованным членом суперсемейства нейротрансмиттерных ионных каналов. Исследование экспрессии гена  $\alpha 7$ -субъединицы в нескольких типах клеток показало, что сборка белка с функциональным нАХР является сложной. В нейронах  $\alpha 7$ -рецепторы собираются в виде гомопентамера, состоящего из пяти отдельных  $\alpha 7$ -субъединиц [23], хотя  $\alpha 7$ -субъединицы, по-видимому, образуют функциональные гетеропентамеры с  $\beta 2$ -субъединицами, если экспрессируются в ооцитах *Xenopus laevis* или эпителиальных клетках почки

человека tsA201 [24]. Однако, сборка  $\alpha 7$ -субъединиц в функциональный гомопентамерный рецептор требует наличия белка Ric-3 [25] и/или посттрансляционного процессинга  $\alpha 7$ -субъединицы [23].

Ген  $\alpha 7$ -субъединицы включает 10 экзонов с 4 трансмембранными доменами, кодируемыми экзонами 7–10, 3 предполагаемых сайта гликозилирования и лиганд-связывающие сайты, которые располагаются внеклеточно в экзонах 2–6 (Рис. 3) [26,27].



**Рисунок 3.** Структура  $\alpha 7$  нАХР. *Chrna7* находится в хромосомной области 15q14. Ген содержит десять экзонов, охватывающих 138,5 т.п.н., которые кодируют белок  $\alpha 7$  нАХР с предполагаемой молекулярной массой 50 кДа. Шесть вариантов сплайсинга мРНК были описаны в дополнение к  $\alpha 7$  гену дикого типа, хотя неизвестно, процессируется ли какой-либо из этих транскриптов до функционального белка. Ген *Chrfam7a* представляет частичное дублирование экзонов *Chrna7* человека с 5 по 10. Этот частично дублированный ген комбинируется с четырьмя новыми экзонами (от А до D), образуя новый ген, называемый «гибридным  $\alpha 7$ » [28].

Субъединица  $\alpha 7$  имеет молекулярную массу приблизительно 56 кДа и состоит из 502 ак (аминокислотных остатков), включая N-концевой сигнальный пептид из 22 ак, за которым следует внеклеточный 200-ак лиганд-связывающий домен [29,30]. Змеиные  $\alpha$ -нейротоксины, в частности  $\alpha$ -бунгаротоксин, являются антагонистами с высоким сродством взаимодействующие с  $\alpha 7$  нАХР, что позволяет функционально дифференцировать этот подтип рецептора от других нейрональных нАХР [20,23]. Участок связывания этого токсина находится во внеклеточном N-концевом домене, кодируемом экзонами 1–5. Собранные вместе субъединицы

образуют центральную пору с местом связывания лиганда в области контакта субъединиц, ответственных за изменения состояния рецептора. Трансмембранные домены состоят из четырех  $\alpha$ -спиралей, которые пересекают липидный бислой и образуют ионный канал [26]. Хотя никотиновые рецепторы первоначально описаны как натриевые каналы, гомопентамерный  $\alpha 7$ -рецептор также хорошо проницаем для  $\text{Ca}^{2+}$  [31]. В нейрональных клетках активация  $\alpha 7$  nAХР негативно регулируется фосфорилированием Tyr-386 и Tyr-442 киназами семейства Src, которые непосредственно взаимодействуют с его цитоплазматической петлей [32]. Мутантные  $\alpha 7$  nAХР, лишенные остатков тирозина в цитоплазматической петле из-за замены Tyr-386 и Tyr-442 на аланин, были более активными, чем рецепторы дикого типа, и нечувствительны к ингибированию киназой или фосфатазой. Ген  $\alpha 7$  nAХР человека был картирован в хромосоме 15q14. Шесть вариантов сплайсинга мРНК гена  $\alpha 7$  nAХР были обнаружены в мозге человека, а также в лейкоцитах [33–35], хотя неясно, процессируется ли какой-либо из этих транскриптов до функционального белка.

### **1.1.3 Функциональная роль активации $\alpha 7$ nAХР на иммунных клетках**

Костный мозг иннервируется парасимпатическими холинергическими нервными волокнами, и несколько типов клеток, такие как миелоидные и лимфоидные клетки (В-клетки, микроглия, моноциты и дендритные клетки (DC)) функционально чувствительны к никотину и ацетилхолину. Исследования, проведенные в последние годы, показали, что холинергическая система может модулировать различные биологические реакции как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа. Было показано, что ацетилхолин - элемент нейрональной холинергической системы - обладает противовоспалительным действием. Ацетилхолин может воздействовать на иммунную систему двумя различными способами – аутокринно и паракринно (иммунные клетки обладают способностью к секреции ацетилхолина) или приводить к стимуляции нервной системы [11,36].

«Холинергический противовоспалительный путь» играет важную роль в иммунном ответе и в воспалительных каскадах. Нейрональная холинергическая система влияет также на пролиферацию иммунных клеток, дифференцировку Т-хелперов, презентацию антигенов и продукцию цитокинов.  $\alpha 7$  nAХР является частью не-нейрональной холинергической системы, и играет специфическую роль в иммунном ответе. Он локализуется в различных иммунных клетках, таких как макрофаги, дендритные клетки, Т- и В-лимфоциты, в тучных клетках и базофилах [37–39].

### *Никотиновые рецепторы на Т-лимфоцитах и NK-клетках*

Эпителий тимуса, Т-клетки в тимусе и зрелые Т-клетки экспрессируют nAХР [40]. Подавляющее влияние никотина на иммунный ответ, а также на экспрессию никотиновых рецепторов в Т-лимфоцитах было обнаружено ранее [41,42], однако роль  $\alpha 7$  nAХР четко не определена. Лимфоциты экспрессируют большинство компонентов холинергической системы, включая ацетилхолин, мускариновые и никотиновые рецепторы, холин-ацетилтрансферазу (ChAT), высокоаффинный холиновый транспортер и ацетилхолинэстеразу. Лимфоциты могут продуцировать ацетилхолин. Сообщалось об экспрессии  $\alpha 7$  nAХР в Т-лимфоцитах и клеточных линиях, происходящих из Т-лимфоцитов [43]. На основании этих сообщений было предположено, что ацетилхолин влияет на способность Т-клеток участвовать в иммунном ответе. Стимуляция nAХР с помощью ацетилхолина или никотина вызывает передачу сигналов  $Ca^{2+}$  и активацию экспрессии c-fos в Т-клетках [44], но этот эффект может опосредоваться как мускариновыми АХР, так и  $\alpha 7$  nAХР [45]. Предполагается, что активация  $\alpha 7$  nAХР усиливает индуцированный кортизолом апоптоз Т-клеток [41]. Rosas-Bollina и соавторы [46] продемонстрировали роль блуждающего нерва и ацетилхолина в контроле врожденного иммунного ответа. Блуждающий нерв оказывал стимулирующее действие на продуцирующие ацетилхолин Т-клетки памяти, которые были необходимы для ингибирования продукции цитокинов. Хроническая

стимуляция никотином подавляла экспрессию nAChR и активность Т-клеток [47]. Более того было обнаружено [48], что стимуляция рецептора Т-клеток (TCR) с использованием активатора Т-клеток - фитогемагглютинина (РНА), индуцирует синтез и высвобождение ацетилхолина в клетках MOLT-3 и HSB-2 (линии Т-клеточной лейкемии человека). Хорошо известно, что антагонисты  $\alpha 7$  nAChR, такие как  $\alpha$ -бунгаротоксин ( $\alpha$ -bgt) и метилликаконитин (MLA), усиливают пролиферацию Т-клеток [49]. Последние данные указывают на то, что  $\alpha 7$  nAChR, по-видимому, является ключевым регулятором иммунодепрессивных функций  $CD4^+CD25^+$  регуляторных Т-клеток [50]. Кроме того, Nordman и соавторы [51] выявили, что не только  $\alpha 7$  nAChR, но также и  $\alpha 4$  nAChR участвуют в пролиферации  $CD4^+$  Т-клеток и иммунном ответе Т-клеток-хелперов.

НК-клетки составляют 5–15% лимфоидных клеток периферической крови человека и являются критическими при иммунном ответе против внутриклеточных инфекционных агентов и опухолей [52]. НК-клетки также обладают иммунорегуляторными свойствами, вследствие секреции множества цитокинов, таких как IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF и хемокинов, которые способствуют модуляции врожденного иммунного ответа и смещают адаптивный иммунный ответ по Th1-опосредованному профилю через взаимодействия с DC и макрофагами [53,54]. В исследовании Zanetti и соавторов было показано [55], что НК-клетки человека также экспрессируют  $\alpha 7$  nAChR. Стимуляция НК-клеток цитокинами и PNU 282987 снижала уровни экспрессии NF- $\kappa$ B и ядерную мобилизацию, подавляла экспрессию рецептора NKG2D и снижала NKG2D-зависимую клеточную цитотоксичность и продукцию IFN- $\gamma$ . Кроме того, такие НК-клетки были менее эффективны для запуска созревания DC. Таким образом, полученные результаты демонстрируют противовоспалительную роль  $\alpha 7$  nAChR в НК-клетках и предполагают, что модуляция его активности в НК клетках может представлять собой новую мишень для регуляции иммунного ответа.



### ***Никотиновые рецепторы на В-лимфоцитах***

На антиген-зависимую активацию В-клеток также могут влиять и никотиновые агонисты. Сообщалось об экспрессии  $\alpha 7$  nAChR в В-лимфоцитах [18], в частности, в рециркулирующих В-клетках [42]. Однако следует отметить, что в дополнение к  $\alpha 7$  на В-лимфоцитах обнаруживаются гетеромерные  $\alpha 4\beta 2$  nAChR [56], а дефицит этих субъединиц влияет как на преиммунный статус мышей, так и на их иммунный ответ. Оба этих никотиновых рецептора, по-видимому, влияют на передачу сигналов и экспрессию костимулирующего белка CD40 на В-клетках. Функциональный вклад подтипов  $\alpha 7$  или  $\alpha 4\beta 2$  nAChR в биологические эффекты никотина или ацетилхолина неясен. Исследования показывают, что как  $\alpha 4\beta 2$ , так и  $\alpha 7$  nAChR могут участвовать в созревании p $\mu$ e/p $\mu$ o В-клеток в костном мозге и в их превращении в циркулирующие В-клетки. С использованием генетически модифицированных мышей, которые не имеют ни одного из двух упомянутых рецепторов в своих клетках-предшественниках костного мозга, было показано, что  $\alpha 7$  или  $\beta 2$  nAChR стимулируют развитие В-клеток на стадии p $\mu$ e-В-клеток [42]. Блокирование  $\alpha 7$  nAChR в ходе активации В-клеток способствовало их пролиферации, но предотвращало продукцию IgM [57]. Отсутствие любого из двух подтипов nAChR, но в особенности  $\alpha 4\beta 2$  nAChR, уменьшало количество периферических В-клеток, тогда как, с другой стороны, обработка никотином увеличивала количество В-лимфоцитов в костном мозге.

### ***Никотиновые рецепторы и дендритные клетки***

В то время как макрофаги инициируют многие воспалительные и врожденные иммунные функции, дендритные клетки (DC) являются главными антигенпрезентирующими клетками (APCs) и основными клетками для инициации клеточного иммунного ответа против инфекции. В серии исследований *in vitro* сообщается, что DC экспрессируют  $\alpha 7$  nAChR и что

воздействие никотина или ацетилхолина изменяет функцию DC [58–60]. Следовательно, надо иметь в виду, что некоторые противовоспалительные эффекты при стимуляции блуждающего нерва или введение никотиновых агонистов могут быть опосредованы, по меньшей мере частично, измененной функцией DC, а не циркулирующей или резидентной активностью моноцитов/макрофагов. *In vitro* незрелые моноцитарные DC созревают в ответ на триггеры бактериального антигена, такие как липополисахарид (LPS). Если DC созревают в присутствии никотина, то зрелые DC проявляют более низкую эндоцитарную и фагоцитарную активность по сравнению с исходными клетками. В зрелых DC воздействие никотина снижает выработку IL-12 и способность DC индуцировать APC-зависимые ответы T-клеток, за счет снижения продукции IFN- $\gamma$ . Интересно отметить, что другие исследователи считают, что влияние никотина на функции DC имеет провоспалительный характер. Воздействие на зрелые DC низких (нМ) доз никотина вызывало повышенную экспрессию молекул с костимулирующей активностью и способствовала увеличению секреции IL-12 Th1 T-лимфоцитами в семь раз [58]. Этот эффект был опосредован активацией сигнальных путей фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), Akt и p38 митоген-активируемой протеинкиназой (MAPK).

Причина таких противоположных эффектов может заключаться в статусе созревания DC во время анализа, что затрудняет оценку влияния холинергической модуляции DC *in vivo* на воспалительные заболевания. Ясно, что экспрессия  $\alpha 7$  nAChR в DC наводит на мысль о холинергической регуляции их активности, но необходимы дальнейшие исследования *in vivo* для определения роли блуждающего нерва в модулировании их функций с использованием животных моделей воспаления.

***Никотиновые рецепторы на моноцитах, макрофагах, нейтрофилах и тучных клетках***

Макрофаги являются эффекторными клетками, необходимыми для раннего распознавания и уничтожения патогенных организмов, проникающих через большинство тканей организма, включая кишечник, кожу и легкие. В моноцитах и макрофагах никотин вызывает изменение их функций, таких как уничтожение микробов [16], ингибирование LPS-стимулированной продукции TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8, простагландина E2 (PGE2) и других провоспалительных медиаторов, и, как было недавно продемонстрировано, экспрессию LPS-чувствительных рецепторов, таких как CD14 и Toll-подобный рецептор 4 [61]. Макрофаги, выделенные из мышей дикого типа, продуцировали значительно более низкие уровни TNF- $\alpha$  после стимуляции LPS, если за 5-10 минут до обработки LPS, они были предварительно проинкубированы с никотином (10-1 мкМ) или ацетилхолином (10 мкМ), чем макрофаги, выделенные из нокаутных  $\alpha 7$  nAChR мышей [8]. В культурах макрофагов, стимулированных LPS, ацетилхолин ослаблял высвобождение цитокинов: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 и IL-18, но не продукцию противовоспалительного цитокина IL-10 [7]. Точно так же Rosas-Ballina и соавторы [62] показали, что агонист  $\alpha 7$  nAChR, такой как GTS-21, подавляет выработку провоспалительных цитокинов (в основном TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$ ) в ответ на различные лиганды toll-подобного рецептора (TLR), например, агонисты TLR2, TLR3 и TLR9. Эта взаимосвязь также наблюдалась в культуре клеток микроглии, где предварительная обработка ацетилхолином и никотином ингибировала LPS-индуцированное высвобождение TNF- $\alpha$  [63]. Обработка никотином клеточной линии альвеолярных макрофагов мыши (экспрессирующей  $\alpha 4$  и  $\beta 2$ , но не  $\alpha 7$ ) приводит к усилению внутриклеточной репликации *Legionella pneumophila*. Кроме того, продукция воспалительных цитокинов IL-6, TNF- $\alpha$  и IL-12 подавлялась никотином в этих клетках. Потенциальным результатом этого эффекта может быть то, что, с одной стороны, воспалительные реакции становятся слабее, но, с другой стороны, противовоспалительные свойства никотина фактически увеличивают выживаемость вторгающихся микробов или вирусов и вызывают значительно

более высокие титры вируса после заражения [64]. В этой связи следует отметить, что некоторые инфекции, такие как пневмония, вызываемая *Streptococcus pneumoniae*, чаще встречаются у курильщиков [65]. Следовательно, эти исследования предполагают, что лечение никотиновыми агонистами может обеспечить фармакологическую стратегию для сдерживания воспаления, но хроническое воздействие никотина или никотиновых агонистов может способствовать устойчивому противовоспалительному ответу, который способствует развитию некоторых инфекций легких, наблюдаемых у курильщиков табака, и их подверженности хроническим заболеваниям, таким как обструктивная болезнь легких [66]. Помимо функции макрофагов, никотин изменяет различные функции нейтрофилов, такие как продуцирование супероксид-анионов [67], хемотаксис, экспрессию  $\beta 2$ -интегрина [68], продуцирование хемокинов [69], и подавляет апоптоз [70]. Кроме этого ранее было продемонстрировано, что никотин и ацетилхолин способствуют увеличению адгезии полиморфноядерных нейтрофилов, а данные эффекты блокировались с помощью специфических nAChR антагонистов, указывая на роль nAChR в биологических функциях нейтрофилов [71].

Исследования, проведенные на крысах, показали, что ацетилхолин, холин и никотин вызывают дегрануляцию тучных клеток [72]. Mishra и соавторы [73] продемонстрировали, что никотин влияет на позднюю, но не раннюю фазу дегрануляции тучных клеток. Авторы предположили, что nAChR, локализованные на тучных клетках, могут быть важным компонентом новых терапевтических подходов для контроля аллергических заболеваний и астмы.  $\alpha 7$  nAChR-специфический агонист GTS-21 также проявляет противовоспалительное действие на тучные клетки, полученные из оболочек костного мозга (mBMMC), и ингибирует IgE-индуцированную дегрануляцию [74].

### *Никотиновые рецепторы на миелоидных клетках и микроглии*

Клетки микроглии представляют самый большой класс фагоцитов в центральной нервной системе (ЦНС). Параллельно с активацией фагоцитов в не-нейронных тканях, результат активации микроглии может быть нейропротективным или нейротоксическим. Общеизвестно, что здоровые нейроны и астроциты в своем микроокружении могут регулировать величину опосредованных микроглией врожденных иммунных ответов посредством активации  $\alpha 7$  nAChR среди других нейротрансмиттерных рецепторов, таких как пуриnergические рецепторы P2X7 [75]. Первичные культуры как покоящейся, так и активированной микроглии, а также астроциты, синтезируют ацетилхолин [76], предполагая, что этот нейротрансмиттер может действовать как местный гормон и вносить вклад в регуляцию функций микроглии.

В нормальном здоровом мозге микроглия имеет типичный фенотип покоя по сравнению с другими тканевыми макрофагами, но они быстро реагируют на острые и хронические инсульты. Активированная микроглия может иметь решающее значение при патологии ЦНС посредством высвобождения свободных радикалов, а также цитокинов и токсических факторов [77]. Альтернативно, микроглия может выполнять нейропротекторные функции, секретируя факторы роста или диффундирующие противовоспалительные медиаторы, которые помогают устранить воспаление и восстановить гомеостаз тканей [78]. Культивируемая микроглия экспрессирует  $\alpha 7$  nAChR, а никотин и ацетилхолин ингибируют продукцию TNF- $\alpha$  в LPS-стимулированных микроглиальных культурах мышей [79]. Это ингибирование продукции TNF- $\alpha$  связано со снижением фосфорилирования p44/42 и p38 MAPK. Никотин также действует как противовоспалительное средство для микроглии, увеличивая экспрессию COX-2 и синтез PGE2, который, как известно, подавляет активацию микроглии и экспрессию провоспалительных генов, включая TNF- $\alpha$  [80]. Однако, никотин не влияет на высвобождение NO, IL-1b и IL-10.

Противовоспалительный эффект никотина на LPS-индуцированную продукцию TNF- $\alpha$  и высвобождение PGE2 отменялся антагонистом  $\alpha 7$  рецептора,  $\alpha$ -бунгаротоксином, что демонстрирует ключевую роль  $\alpha 7$  nAХР.

Никотин может защищать от развития нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и Паркинсона, при которой микроглиальные клетки поддерживают местный воспалительный ответ [77,81–83]. Потенциал  $\alpha 7$  nAХР в опосредовании воспаления ЦНС приобрел клинический интерес с момента открытия участия  $\alpha 7$  nAХР в нейротоксичности, вызванной  $\beta$ -амилоидом (Abeta (1–42)), критическим фактором в патологии болезни Альцгеймера. Одной из основных особенностей этого заболевания, является уменьшение экспрессии nAХР в областях мозга, таких как кора головного мозга и гиппокамп. Эта потеря объясняется потерей холинергических клеток, что способствует когнитивной дисфункции. Наиболее уязвимыми нейронами, по-видимому, являются те, которые в большой степени экспрессируют  $\alpha 7$  nAХР. Исследования *in vivo* ясно указывают на то, что  $\alpha 7$  nAХР играют критическую роль в защите от холинергических поражений и улучшении когнитивной функции [81]. Многие данные указывают на связывание Abeta (1–42) с  $\alpha 7$  nAХР, что служит основным запускающим фактором гибели нейронов при болезни Альцгеймера. Высокоаффинное связывание Abeta (1–42) с  $\alpha 7$  nAХР на поверхностях нейрональных клеток приводит к интернализации этого комплекса с nAХР и его накоплению в лизосомальном компартменте [82,83]. Поскольку взаимодействие  $\alpha 7$  nAХР-Abeta (1–42) также приводит к ингибированию высвобождения ацетилхолина и потока кальция и даже к гибели клеток *in vitro*, предполагается, что это взаимодействие может быть одним из ключевых событий в патогенезе болезни Альцгеймера.

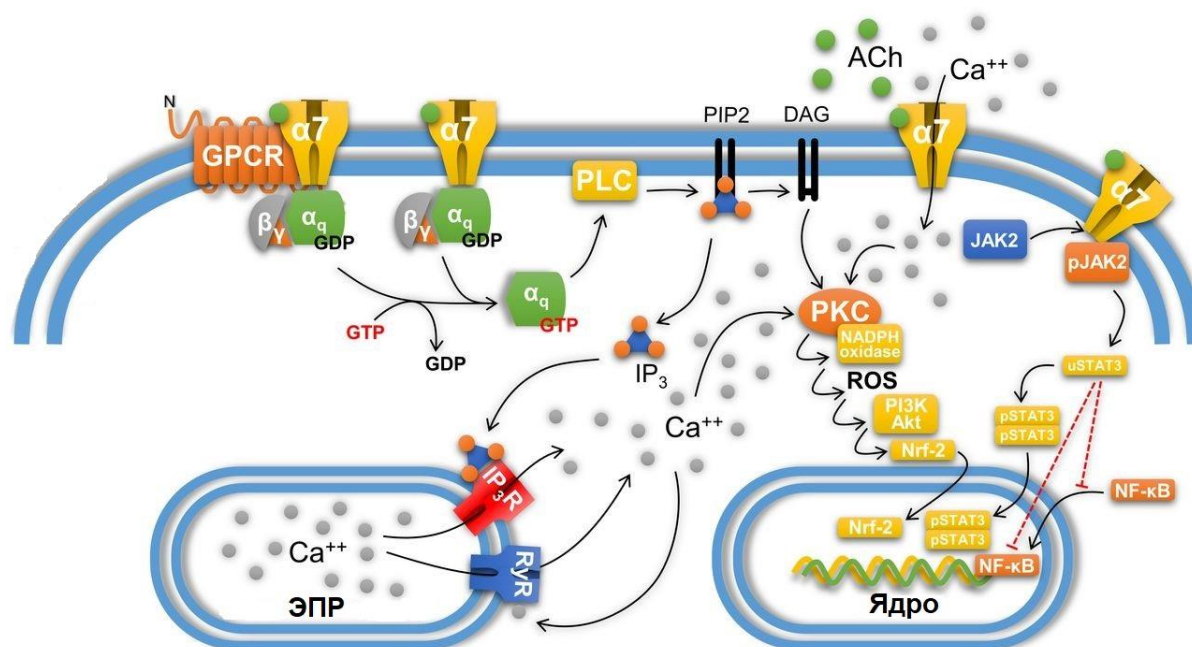
Имеются данные, свидетельствующие о том, что агонисты  $\alpha 7$ -рецептора обладают нейропротективным действием в отношении токсичности Abeta (1–42) в различных культуральных системах. Этот эффект, по-видимому,

опосредован  $\alpha 7$ -подтипом nAChR, поскольку защита блокируется  $\alpha$ -бунгаротоксином и имитируется  $\alpha 7$ -селективными агонистами [84,85]. В нейрональной клеточной линии PC12 взаимодействие никотина с  $\alpha 7$  nAChR ингибирует связывание Abeta (1–42) с тем же рецептором и предотвращает Abeta (1–42) - индукцию каспазы 3 и апоптоза. Последнее, по-видимому, является результатом никотиновой активации тирозинкиназы Janus kinase 2 (Jak2) и активации фосфатидилинозитол-3-киназы и Akt-сигнальных путей, а не блокады связывания Abeta (1-42) с  $\alpha 7$  nAChR [86]. В свою очередь, никотин-индуцированная активность Jak2-киназы отрицательно опосредована активностью SHP (Src-гомологи содержащие цитоплазматическую фосфатазу-1). Примечательно, что фосфорилирование  $\alpha 7$  nAChR [32] и активация Jak2 путем связывания никотина с  $\alpha 7$  nAChR также были продемонстрированы в не-нейрональных клетках, таких как макрофаги [13] и оральные кератиноциты [87]. Вместе эти данные подтверждают идею о том, что Jak2 играет центральную роль в нейропротекции, индуцируемой  $\alpha 7$  nAChR против Abeta (1-42). Следовательно, эти данные усиливают потенциальную роль  $\alpha 7$ -агонистов в качестве основы лекарств для контроля апоптоза нейронов и  $\alpha 7$ -опосредованной нейропротекции при болезни Альцгеймера.

#### **1.1.4 Активация $\alpha 7$ nAChR и внутриклеточные сигнальные пути**

Недавние исследования расширяют наше понимание внутриклеточных сигнальных путей, вовлеченных в противовоспалительный потенциал ацетилхолина, но точные механизмы еще предстоит установить. Биологические эффекты в клетках, обусловленные активацией  $\alpha 7$  nAChR, опосредованы потоками ионов через ионные каналы, хотя  $\alpha 7$  nAChR также активирует альтернативные сигнальные пути в нейрональных и не-нейронных клетках. В разных не-нейрональных клетках, таких как микроглия и макрофаги [88], активация  $\alpha 7$  nAChR с помощью никотина вызывает увеличение внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$ . Однако это увеличение может происходить из-за высвобождения внутриклеточного  $Ca^{2+}$  после

активации никотином PI3K и фосфолипазы C, а не из-за  $\alpha 7$ -опосредованных  $\text{Ca}^{2+}$ -мембранных потоков. В лейкоцитах человека ни никотин, ни ацетилхолин не вызывают обнаруживаемых мембранных токов [34]. Альтернативно, в нейрональных, а также не-нейрональных клетках агонисты  $\alpha 7$  nAХР запускают фосфорилирование Akt [86,87] посредством активации Jak2 и PI3K. Предыдущие исследования показывают, что среди нескольких путей холинергические агонисты вмешиваются в два критических сигнальных пути, необходимых для активации иммунных клеток: Jak/STAT (сигнальный преобразователь и активатор транскрипции) и сигнальный путь ядерного фактора карраВ (NF- $\kappa$ B) (Рис. 4).



**Рисунок 4.** Двойная ионотропная/метаботропная природа передачи сигналов  $\alpha 7$ -рецептором: внутриклеточный путь, опосредованный активацией  $\alpha 7$ . Этот рецептор пропускает поток  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ . Временное увеличение концентрации кальция может также приводить к устойчивому ответу кальция с помощью механизма, опосредованного через рецепторы IP<sub>3</sub>. Как метаботропный рецептор,  $\alpha 7$  опосредует внутриклеточные сигналы, связываясь с G $\alpha$  и G $\beta\gamma$  белками и рядом других компонентов. Было показано, что  $\alpha 7$ -рецептор активирует JAK2/STAT3 в некоторых иммунных клетках, что приводит к блокаде ядерной транслокации ядерного фактора NF- $\kappa$ B и его ингибированию, что приводит к ингибированию продукции провоспалительных цитокинов. Также было показано, что  $\alpha 7$ -рецептор активирует путь PI3K/Akt, который способствует транслокации Nrf-2 в ядро и сверхэкспрессии гемоксигеназы 1 (HO-1), что приводит к сильным противовоспалительным эффектам [89]. ЭПР – эндоплазматический ретикулум.



Исследования показали, что в отношении различных типов клеток, включая моноциты, макрофаги и эндотелиальные клетки, противовоспалительный потенциал  $\alpha 7$  nAHP опосредуется ингибированием фактора транскрипции NF- $\kappa$ B [90]. Активация NF- $\kappa$ B требует убиквитинирования I $\kappa$ B. Этот процесс позволяет осуществлять ядерную транслокацию субъединиц p65 и/или p50, для модулирования транскрипции генов, чувствительных к NF- $\kappa$ B, таких как IL-6 и iNOS [91]. Активация  $\alpha 7$  nAHP может предотвратить распад I $\kappa$ B и ядерную транслокацию p65, и этот механизм объясняет противовоспалительный потенциал агонистов nAHP в моноцитах, макрофагах и эндотелиальных клетках. Действительно, было показано, что противовоспалительное действие ацетилхолина связано с ингибированием LPS-индуцированной активации NF- $\kappa$ B [92]. Другой компонент противовоспалительного пути, по-видимому, опосредуется передачей сигналов Jak2/STAT3 в нейрональных клетках. Активация  $\alpha 7$  nAHP приводит к рекрутированию и фосфорилированию тирозинкиназы Jak2 и последующей активации фактора транскрипции STAT3 [13,87]. Активация передачи сигналов STAT3 имеет решающее значение для противовоспалительной активности никотина, поскольку никотин не способен снижать продукцию TNF- $\alpha$  в клетках, которые экспрессируют STAT3, мутированный в области фосфорилирования или в ДНК-связывающем домене. Соответственно, стимуляция блуждающего нерва ингибирует воспаление кишечника у мышей дикого типа, но не проявляет этого эффекта у мышей, лишенных STAT3 в их макрофагах (LysM-STAT3fl/fl) [13]. Следовательно, противовоспалительная активность блуждающего нерва включает передачу сигналов Jak2/STAT3. STAT3 является противовоспалительным фактором транскрипции [93], способствующим противовоспалительным эффектам IL-6 и IL-10. Однако STAT3, по-видимому, оказывает свое противовоспалительное действие, не ингибируя транскрипцию провоспалительных генов, таких как TNF, IL-6 и iNOS [94].

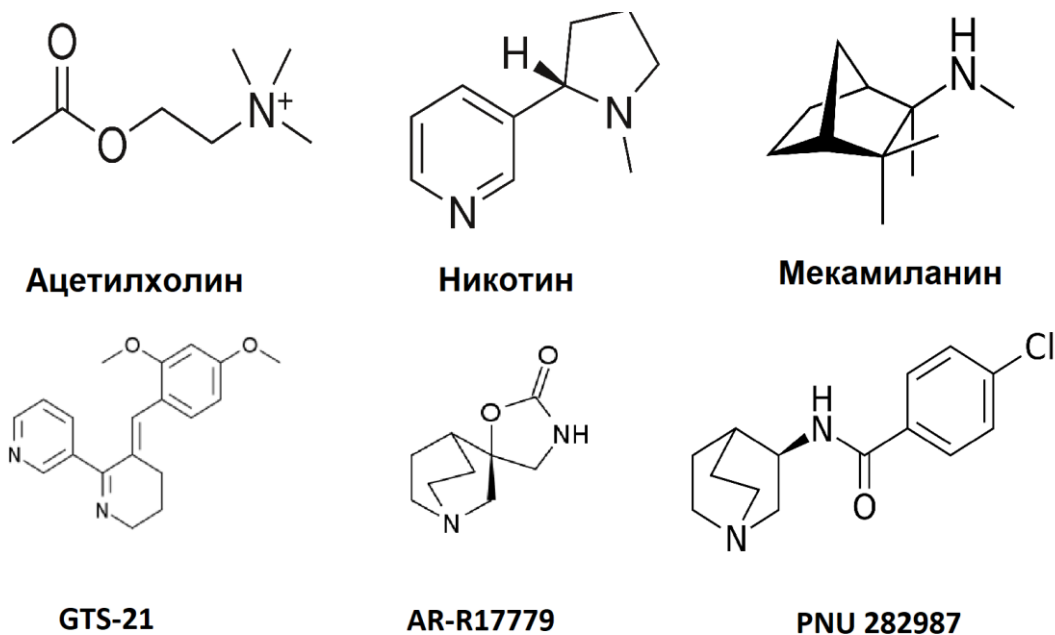
Скорее всего, активация nAХР влияет и на другие сигнальные пути и факторы транскрипции через активацию передачи сигналов Jak/STAT, таких как NF-kB или TGF-b [95]. Следует отметить, что пути NF-kB и STAT3 могут сходиться и взаимодействовать для воспалительной передачи сигналов, поскольку гомодимер NF-kB p65 рекрутируется и ассоциируется со STAT3 после активации [96,97].

В дополнение к Jak/STAT и NF-kB путям, холинергические агонисты могут модулировать несколько других сигнальных путей, таких как внеклеточные сигнальные киназы (ERK; p44/p42 MAPK) [61]. Недавние исследования также указывают на то, что никотин индуцирует продукцию PGE2 за счет повышения экспрессии циклооксигеназы (COX-2) в моноцитах человека [98]. PGE2 вызывает повышение уровней циклического АМР и активности протеинкиназы А (РКА). В соответствии с этими результатами, ингибиторы COX-2 и РКА предотвращают влияние никотина на экспрессию молекул адгезии и выработку цитокинов, указывая на то, что механизм действия никотина может заключаться в эндогенной продукции PGE2. В заключение, активация  $\alpha 7$  nAХР запускает спектр сигнальных механизмов, которые в воспалительных клетках, как правило, являются противовоспалительными, прямо или косвенно приводящими к ингибированию активации NF-kB и/или трансдукции сигнала Jak/STAT.

### **1.1.5 Возможное фармакологическое использование агонистов nAХР**

Селективные никотиновые агонисты были первоначально разработаны для имитации когнитивных эффектов никотина у пациентов с неврологическими расстройствами, избегая при этом токсичности никотина. Наиболее характерными специфическими  $\alpha 7$  nAХР агонистами являются GTS21, ARR17779, CAP55, Eho2 и PNU 282987 [99]. Среди них наиболее известным является GTS21, частичный  $\alpha 7$  nAХР агонист, предназначенный

для компенсации потери этого рецептора в коре головного мозга и гиппокампе у пациентов с болезнью Альцгеймера (Рис. 5).



**Рисунок 5.** Структуры холинергических агонистов и антагонистов. Ацетилхолин может передавать сигналы через мускариновые (G-белок сопряженные рецепторы) или никотиновые (лиганд-управляемые ионные каналы) рецепторы. Никотин, более селективный и стабильный холинергический агонист, более эффективен, чем ацетилхолин, в качестве противовоспалительного агента. Противовоспалительный потенциал никотина, по-видимому, опосредован  $\alpha 7$  nAHP, и в настоящее время исследования направлены на разработку селективных  $\alpha 7$  nAHP агонистов [28].

*In vitro* GTS21 может защищать нейроны от повреждения, вызванного амилоидными пептидами, что позволяет предположить, что  $\alpha 7$  nAHP могут выполнять защитную роль для нейронов. GTS21 является частичным агонистом, который влияет и на другие никотиновые рецепторы, включая  $\alpha 4\beta 2$  nAHP [100]. Лечение с помощью GTS21 оказало положительное влияние на психологические и когнитивные тесты, проведенные на здоровых добровольцах в клинических испытаниях Taiho Pharmaceutical Co. (Токио, Япония). Однако, GTS21 оказывал ограниченный терапевтический эффект в клинических испытаниях у пациентов с болезнью Альцгеймера. Хотя причины этого эффекта остаются неизвестными, некоторые авторы предположили, что GTS21 может иметь ограниченную способность преодолевать гематоэнцефалический барьер. С иммунологической точки зрения эта

характеристика является преимуществом, позволяющим избежать потенциальных вторичных эффектов GTS21 в ЦНС. В отличие от никотина, GTS21 не влияет на двигательную активность у мышей или на обмен дофамина у крыс, что указывает на то, что он менее токсичен, чем никотин [99,100]. В отличие от исследований с использованием никотина, пациенты хорошо переносили дозы до 450 мг/день GTS21, и между группами пациентов не было клинически значимых различий в побочных эффектах. Недавние испытания показали, что GTS21, по-видимому, оказывает положительное влияние на нейрокогнитивное развитие у лиц с шизофренией [101]. Предстоящие исследования необходимы для того, чтобы определить, основан ли потенциал никотиновых агонистов на их связывании с рецепторами нейронов и их противовоспалительный вклад в качестве терапевтических средств при неврологических расстройствах.

Противовоспалительное действие GTS21 было проанализировано на экспериментальных моделях панкреатита [102]. Хирургическая ваготомия или предварительная обработка мекамиламином привела к усилению тяжести панкреатита, вызванного внутрибрюшинными инъекциями у мышей. Число нейтрофилов, мигрирующих в поджелудочную железу, было увеличено у этих мышей, о чем свидетельствовало наличие миелопероксидазы. Напротив, предварительная обработка GTS21 сильно снижала тяжесть панкреатита. Следует отметить, что воспаление легких, связанное с панкреатитом, не зависело от целостности блуждающего нерва и никотиновых рецепторов. Эти результаты согласуются с другими исследованиями, указывающими на то, что блуждающий нерв обладает очень ограниченным противовоспалительным потенциалом в легких [7].

Одним из других никотиновых агонистов, используемых в экспериментальных моделях воспаления, является CAP55, который применяли для изучения потенциального противовоспалительного действия никотиновых агонистов в эндотелиальных клетках [92]. CAP55 ингибировал

LPS-индуцированную продукцию TNF- $\alpha$  и TNF-индуцированную продукцию хемокинов в культурах макрофагов человека, дифференцированных от мононуклеарных клеток периферической крови и микрососудистых эндотелиальных клеток (HUMVEC). *In vitro* никотин и CAP55 блокировали TNF-индуцированную экспрессию молекул адгезии в HUMVEC и предотвращали адгезию моноцитов и нейтрофилов к этим клеткам. В экспериментальной модели подкожного воздушного мешка, вызванного каррагинаном, как стимуляция блуждающего нерва, так и никотиновые агонисты значительно блокировали миграцию лейкоцитов через механизм, зависящий от nAHR, которые ингибировались мекамиламином [103]. Эти результаты согласуются с предыдущими исследованиями, свидетельствующими о том, что никотин усиливает ангиогенный ответ на воспаление. Никотин усиливал рост эндотелиальных клеток и ускорял рост фиброваскулярных сосудов *in vivo*. На мышинной модели ишемии задних конечностей, рака легких и атеросклероза, никотин усиливал рост капилляров и очагов поражения в сочетании с увеличением пораженности кровеносных сосудов. Повышенная васкуляризация опухолевой ткани была связана с более высоким ростом опухоли в группе с никотином. Лечение никотином вызывало более высокие уровни VEGF (фактор роста эндотелия сосудов) в сыворотке, и ангиогенный эффект отменяли ингибитором COX-2 [98].

Терапевтический противовоспалительный потенциал никотина при язвенном колите не наблюдается при других воспалительных заболеваниях кишечника. Лечение никотином не оказывает терапевтического воздействия на пациентов с болезнью Крона. В отличие от язвенного колита, болезнь Крона представляет собой воспалительное заболевание кишечника, которое поддается лечению антибиотиками, такими как метронидазол и терапией против TNF- $\alpha$ . Очевидно, что эти два воспалительных заболевания имеют различный патогенез и дифференциальное участие функции макрофагов. Альтернативное объяснение разного влияния никотина на язвенный колит и

болезнь Крона заключается в том, что они могут представлять разные уровни холинергического противовоспалительного механизма. Язвенный колит может характеризоваться дефектом выработки ацетилхолина, который можно устранить путем введения никотина. Однако болезнь Крона может характеризоваться дефектами никотинового рецептора или сигнального пути, которые препятствуют способности кишечных иммунных клеток реагировать на никотин или ацетилхолин. Следует отметить, что подобный механизм может применяться к таким заболеваниям как артрит. Курение, по-видимому, обеспечивает некоторую защиту от остеоартрита, но повышает риск развития ревматоидного артрита [104]. Если специфические мутации в nAChR могут предотвращать активацию этих рецепторов ацетилхолином или никотином, необходимы дальнейшие исследования для определения потенциального эффекта аллостерических модуляторов и специфических агонистов, способных активировать эти рецепторы без взаимодействия с сайтом связывания ацетилхолина [105]. Наиболее характерными примерами являются физостигмин и галантамин (Reminyl; Janssen Pharmaceutica, Titusville, NJ, США); оба относятся к классу ингибиторов ацетилхолинэстеразы, одобренных Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов для симптоматического лечения шизофрении и болезни Альцгеймера. Их эффективность основывается на усилении холинергической передачи сигналов путем ингибирования ацетилхолинэстеразы и предотвращения деградации ацетилхолина. Тем не менее, специфичность этих соединений является сомнительной, и их использование имеет множество нейротоксических побочных эффектов. Необходимы дальнейшие исследования для определения противовоспалительного потенциала этих соединений в иммунных клетках.

Противовоспалительные свойства селективного агониста  $\alpha 7$  nAChR - PNU 282987 были подтверждены *in vitro* с использованием макрофагов [106]. Su и соавторы [107] продемонстрировали, что предварительное

интраперитонеальное введение PNU 282987 ослабляло вызванную кислотой острую легочную травму у мышей. Не и соавторы [108] обнаружили, что активация  $\alpha 7$  nAHP ослабляет повреждение легких, связанное с тяжелыми воспалительными процессами в альвеолярных клетках эпителия, вызванное ишемией или реперфузией в кишечнике. В исследовании Shao и соавторов [109] было установлено, что PNU 282987 значительно уменьшал инфильтрацию воспалительных клеток и повреждение легких, даже когда лечение начинали через 2 часа после пункции слепой кишки (CLP). Было обнаружено, что, когда PNU 282987 вводили септическим мышам, повышенные уровни генов, кодирующих провоспалительные цитокины в легких и секреция IL-6 в бронхоальвеолярной жидкости (BALF) существенно снижались, полагая, что введение PNU 282987 может уменьшать локальное воспаление у септических мышей.

Вышеуказанные результаты исследований показывают, что активация  $\alpha 7$  nAHP облегчает вызванное сепсисом повреждение легких, и в целом указывают на то, что PNU 282987 обладает потенциальными профилактическими и терапевтическими функциями для защиты от ранних воспалительных реакций при сепсис-индуцированной травме легких.

### **1.1.6 Пуринергические рецепторы P2X7 и их роль в «Холинергическом противовоспалительном пути»**

Интерлейкин (IL) -1 $\beta$  представляет собой мощный провоспалительный цитокин, который играет центральную роль в защите организма человека от инфекций и в основном продуцируется моноцитами, макрофагами и дендритными клетками. Однако, чрезмерное системное высвобождение IL-1 $\beta$  в значительной степени способствует развитию опасных для жизни системных воспалительных заболеваний, включая синдром системного воспалительного ответа (SIRS) [110]. Высвобождение IL-1 $\beta$  строго контролируется и часто зависит от двух последовательных сигналов. LPS, основной компонент

клеточной стенки грамотрицательных бактерий, является типичным первым сигналом, который индуцирует биосинтез про-IL-1 $\beta$ , неактивного цитоплазматического предшественника IL-1 $\beta$ . Многочисленные сигналы могут запускать сборку разнообразных мультибелковых комплексов, так называемых инфламмасом, которые активируют протеазы для расщепления про-IL-1 $\beta$  [111]. Внеклеточный АТФ, в основном поступающий из цитоплазмы поврежденных клеток, является вторым сигналом. АТФ активирует пуриnergический рецептор P2X7 и обеспечивает выход ионов калия из клетки [111]. Снижение концентрации калия в цитоплазме запускает сборку инфламмасы, содержащей NLRP3 (NACHT, LRR и PYD домены, белок 3), с последующей активацией каспазы-1 (casp-1), расщеплением про-IL-1 $\beta$  и высвобождение биоактивного IL-1 $\beta$  [111]. Механизмы, контролирующие активацию инфламмасом, индуцированную АТФ, находятся в центре внимания медицинских исследований из-за их исключительной значимости для контроля SIRS и сепсиса.

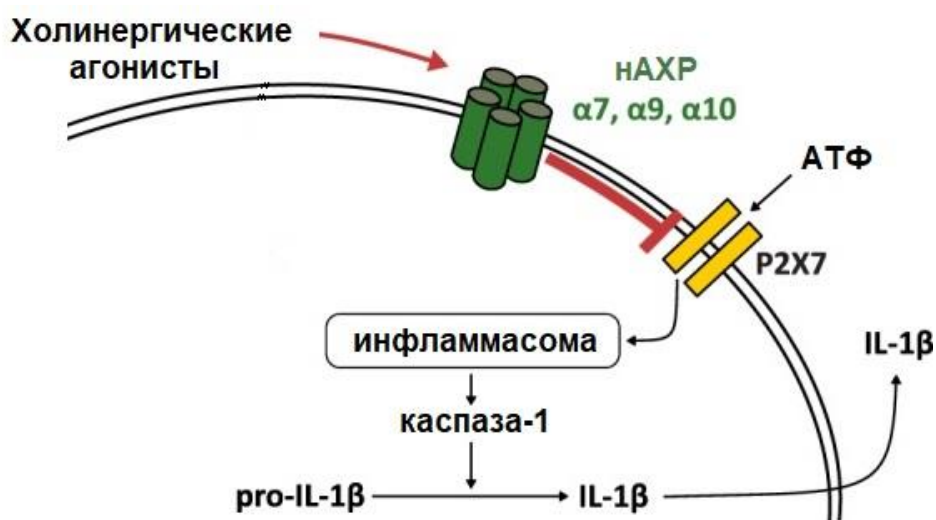
Ацетилхолин был первым идентифицированным нейротрансмиттером, но он также является регулятором иммунной системы с противовоспалительным потенциалом [112]. В настоящее время преобладает мнение, что стимуляция блуждающего нерва запускает высвобождение норэпинефрина, что стимулирует высвобождение ацетилхолина из Т-клеток памяти селезенки. Высвобожденный ацетилхолин воспринимается макрофагами селезенки через  $\alpha 7$ -содержащие nAChR [46] что приводит к изменениям в экспрессии цитокинов через сигнальный путь Jak2-STAT3 [13]. Предполагается, что этот путь подавляет LPS-индуцированную экспрессию про-IL-1 $\beta$ , но не его расщепление или высвобождение.

Многочисленные бактерии и паразиты, колонизирующие млекопитающих, экспрессируют компоненты клеточной стенки и секреторные макромолекулы, модифицированные фосфохолином (ФХ), молекулой, имеющей структурное сходство с ацетилхолином.



Макромолекулы, модифицированные ФХ, оказывают сильное противовоспалительное действие на врожденный и адаптивный иммунитет и помогают уклоняться от иммунной системы хозяина [113]. Например, внеклеточные бактерии, хронически колонизирующие верхние дыхательные пути человека, такие как возбудитель *Haemophilus influenzae*, несут ФХ-модификации в своих LPS. ФХ-модифицированный LPS является фактором вирулентности, который зависит от генов, кодируемых в опероне *lic1* [114]; однако точный молекулярный механизм его противовоспалительного действия все еще неясен.

В исследовании Нескер и соавторов [115] впервые были предоставлены доказательства нового холинергического механизма, который эффективно ингибирует АТФ-опосредованную секрецию зрелого IL-1 $\beta$  из моноцитов через нАХР, содержащие субъединицы  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$  и  $\alpha 10$  (рис. 6).



**Рисунок 6.** Схематическое изображение (фосфо-) холинергического ингибирования АТФ-индуцированной активации инфламмосом в моноцитах. Эндогенные лиганды  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$  и/или  $\alpha 9$  нАХР, такие как ацетилхолин, холин или ФХ, ингибируют АТФ-зависимое высвобождение IL-1 $\beta$ . Модифицированные ФХ макромолекулы паразитарного и бактериального происхождения являются эффективными агонистами  $\alpha 9$  нАХР, ингибируя АТФ-зависимое высвобождение IL-1 $\beta$ .

Этот механизм запускается каноническими эндогенными лигандами этих рецепторов, а также ФХ и ФХ-модифицированными макромолекулами, продуцируемыми бактериями. Эксперименты с активированными мононуклеарными лейкоцитами, выделенными из аллотрансплантатов почек

крыс в начале острого отторжения, показали, что ацетилхолин ингибирует VzАТФ-индуцированное высвобождение IL-1 $\beta$ . В экспериментах выполненных на линии моноцитарных клеток человека U937 или на первичных лейкоцитах крови показано, что секреция IL-1 $\beta$  клетками U937, праймированными LPS, эффективно ингибировалась ацетилхолином и никотином. Поскольку холин также был эффективен, было сделано предположение, что  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$  и  $\alpha 9\alpha 10$  nAХР опосредуют такое ингибирование. Действительно, мекамиламин, а также  $\alpha$ -бунгаротоксин и стрихнин, антагонисты  $\alpha 7$  и  $\alpha 9$  nAХР, антагонизировали холинергическое ингибирование высвобождения IL-1 $\beta$ . Ключевая роль  $\alpha 7$  и  $\alpha 9$  nAХР была дополнительно подтверждена нокаутом генов, который значительно ослабил холинергический ингибирующий эффект во всех случаях.

В последующих исследованиях было определено [116], что ФХ и холин действуют как лиганды моноцитарного  $\alpha 9$  nAХР - это было сделано с использованием RgIA4, селективного антагониста этих рецепторов, который дозозависимо отменял ингибирование высвобождения IL-1 $\beta$ . Эти данные были дополнительно подтверждены экспериментами по подавлению генов в клетках U937: подавление экспрессии гена  $\alpha 9$  nAХР притупляло ингибирующие эффекты ФХ и холина. Такое же наблюдение было сделано, когда экспрессия гена  $\alpha 10$  nAХР подавлялась, предполагая, что субъединицы  $\alpha 9$  и  $\alpha 10$  nAХР кооперируются в моноцитарных клетках.

Были предприняты попытки определить какой из этапов АТФ-индуцированного сигнального каскада регулируется стимуляцией никотиновых рецепторов. Первым шагом в АТФ-опосредованном созревании про-IL-1 $\beta$  является индукция оттока K<sup>+</sup>, приводящая к снижению внутриклеточной концентрации K<sup>+</sup> и активации инфламмасом [117]. Поскольку нигерицин, токсин, продуцируемый *Streptomyces hygroscopicus*, образует поры для ионов K<sup>+</sup> в клеточной мембране, он индуцирует сборку инфламмасы NLRP3 в отсутствие внеклеточного АТФ [118]. Фактически,

АТФ-независимое, индуцированное нигерицином высвобождение IL-1 $\beta$  не нарушалось стимуляцией никотиновых рецепторов. В нейронах nAChR физически взаимодействуют с P2X-рецепторами, что приводит к перекрестному ингибированию ионных потоков [119]. Соответственно, эксперименты патч-кламп с использованием LPS-праймированных клеток U937 непосредственно показали чувствительное к мекамиламину никотиновое ингибирование VzАТФ-индуцированных ионных токов. Эти данные привели к заключению, что АТФ-опосредованная передача сигналов ингибируется никотиновыми рецепторами и что сборка инфламмасом, запускаемая АТФ-независимыми стимулами, не нарушается. Однако никотин сам по себе не индуцирует ионные токи, что указывает на то, что nAChR, экспрессируемые клетками U937, не образуют функциональные ионные каналы. На таких нетрадиционных метаботропных nAChR антагонисты канонических ионотропных рецепторов могут приобретать агонистическую активность [39], что согласуется с настоящим наблюдением, что никотин разделяет активность с ацетилхолином и холином в ингибировании VzАТФ-индуцированного высвобождения IL-1 $\beta$ , действуя как антагонист ионотропных  $\alpha 9/\alpha 10$  nAChR [120]. В настоящее время неизвестно, как активация моноцитарного nAChR с помощью ФХ или холина проявляется в наблюдаемом ингибировании функции рецептора P2X7. Необходимы дополнительные исследования, чтобы ответить на вопрос о том, как устроены эти метаботропные никотиновые рецепторы и выяснить влияние их канонических лигандов на функцию P2X7 рецептора.

## **1.2 Суперсемейство фосфолипаз А2 и их фармакологический потенциал**

Змеиный яд представляет собой сложную смесь белков и полипептидов с разнообразным фармакологическим действием. Белки и полипептиды составляют около 95% от сухой массы яда [121]. Сообщалось о значительных

различиях в составе яда между близкородственными видами или даже между одними и теми же видами разного географического происхождения [122]. Из всех семейств токсинов яда, фосфолипаза А2 (ФЛА2) - токсин, обладающий ферментативной активностью, повсеместно встречается у змей семейств *Elapidae* и *Viperidae* и является наиболее распространенным токсином.

Семейство фосфолипаз широко распространено в природе и относится к ферментам гидролазам, которые необходимы для метаболизма фосфолипидов и регуляции мембранных липидов, состава мембран, передачи сигналов, пищеварения и воспаления [123]. Эти белки подразделяются на четыре основных семейства (А, В, С и D) в зависимости от участка, расщепляемого в молекуле фосфолипида. ФЛА2 является наиболее изученной группой. Эти ферменты гидролизуют связь в положении sn2 фосфолипидов, высвобождая свободную жирную кислоту и лизофосфолипиды [124]. Свободные жирные кислоты (арахидоновая кислота) могут превращаться в эйкозаноиды (простагландины, тромбоксаны, простациклины и лейкотриены), которые связаны с рядом физиологических и патологических эффектов, таких как воспаление и активация тромбоцитов. Кроме того, лизофосфолипиды также связаны с множеством физиологических ролей в передаче сигналов клетками [123].

### **1.2.1 Основные группы фосфолипаз и механизмы цитотоксичности**

ФЛА2 подразделяются на шесть групп: цитозольные (сФЛА2),  $Ca^{2+}$  - независимые (iФЛА2), фактор активации тромбоцитов ацетилгидролаза (РАФ-АН), лизосомальные ФЛА2 (LyФЛА2), специфические для жировой ткани ФЛА2 (AdФЛА2) и секреторные ФЛА2 (sФЛА2) [123]. Кроме того, sФЛА2 делятся на следующие группы: IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, X, XIA, XIB, XII, XIII и XIV [124]. ФЛА2 из змеиного яда относятся к группе секретируемых ферментов и могут быть отнесены к структурной группе IB (в ядах змей семейства *Elapidae*), токсины которой проявляют гомологию с

ФЛА2 панкреатического сока млекопитающих, а также к группе ПА (в яде змей семейства *Viperidae*), токсины которой гомологичны «воспалительной» ФЛА2 млекопитающих [125]. Хотя семейство ФЛА2 чаще встречается в змеином яде, недавние протеомные исследования показали, что фосфолипазы В (ФЛВ; обнаруживается в различных микроорганизмах) также могут быть обнаружены в змеином яде [126].

sФЛА2 представляют собой белки с молекулярной массой около 14 кДа и разделяют консервативный каталитический механизм, основанный на структуре активного центра, включающего диаду His/Asp и использующего  $\text{Ca}^{2+}$  в качестве важного кофактора для каталитической активности. Змеиные яды являются основным источником секреторных ФЛА2 групп I и II. ФЛА2 яда обладают пресинаптической или постсинаптической нейротоксичностью [127], системной или местной миотоксичностью [128], кардиотоксичностью [129], ингибированием агрегации тромбоцитов [130], антикоагулянтной [131] и вызывающей отек активностью [132]. Было высказано предположение, что нейротоксичность яда связана с  $\beta$ -нейротоксином, ферментом ФЛА2, который ингибирует пресинаптическую нервно-мышечную передачу [133]. Хотя молекулярный механизм недостаточно изучен, исследования показали, что нейротоксические эффекты, оказываемые ФЛА2 ядов, предположительно связаны с притоком цитозольных ионов кальция при связывании с потенциалзависимыми ионными каналами на мембране нейронов [134]. Кроме того, ФЛА2 может вызывать разрушение митохондриальной мембраны дыхательной мышцы в результате гидролиза фосфолипидов [135]. Эти события в дальнейшем приводят к острой нервно-мышечной слабости, за которой следует вялый паралич [136]. В основном, ФЛА2 из яда *Elapidae* существуют как мономерный фермент, в то время как ФЛА2 из яда *Viperidae* могут существовать как в мономерной, так и в димерной форме. Мономерная ФЛА2 *Viperidae* проявляет цитотоксические эффекты, тогда как димерная

ФЛА2 обладает цитотоксическим действием при более низкой дозе и нейротоксичностью при более высокой дозе.

$\text{Ca}^{2+}$  является критическим кофактором для катализа и структура петли в аминокислотной последовательности ФЛА2, участвующей в связывании  $\text{Ca}^{2+}$ , высоко консервативна в большинстве ФЛА2. В структуре ФЛА2 есть три основные  $\alpha$ -спирали и два антипараллельных  $\beta$ -листа, поперечно сшитых дисульфидными связями [137]. Связанные дисульфидом  $\alpha$ -спирали (остатки 37–54 и остатки 90–109) образуют каталитический сайт гидрофобного канала, который облегчает связывание фосфолипидных субстратов [138]. Четыре ключевых остатка в активном центре (His48, Asp49, Tyr52 и Asp99), участвуют в координации  $\text{Ca}^{2+}$ , благодаря образованию водородной связи и сопрягающим взаимодействиям [139]. ФЛА2 из ядов змей можно разделить на две основные группы, а именно ФЛА2 группы I (ГФЛА2) и ФЛА2 группы II (ПФЛА2) в зависимости от расположения дисульфидных связей.

ГФЛА2 состоят из 115–125 остатков с молекулярной массой 13–15 кДа. ГФЛА2 имеет единственную полипептидную цепь, содержащую 6–8 дисульфидных мостиков [6]. Она содержит ~50%  $\alpha$ -спиралей и 10%  $\beta$ -листов [140]. ГФЛА2 имеет эластичную петлю (остатки 57–59), которая связывает  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -листы. ГФЛА2 повсеместно обнаруживается в ядах *Elapids*. ГФЛА2 отличается от ФЛА2 поджелудочной железы млекопитающих тем, что последний фермент имеет панкреатическую петлю с дополнительными пятью аминокислотными остатками в положениях 62–67 [141]. ГФЛА2 далее делится на группу IA и группу IB для ФЛА2 змеиного яда и ФЛА2 поджелудочной железы млекопитающих соответственно. Несмотря на это, в ядах *Oxyuranus scutellatus*, *Micrurus frontalis frontalis*, *Notechis scutatus* и *Ophiophagus hannah* были идентифицированы ферменты ФЛА2 группы IB, в которых присутствует  $\alpha$ -спираль, идентичная таковой ФЛА2 поджелудочной железы млекопитающих [142].

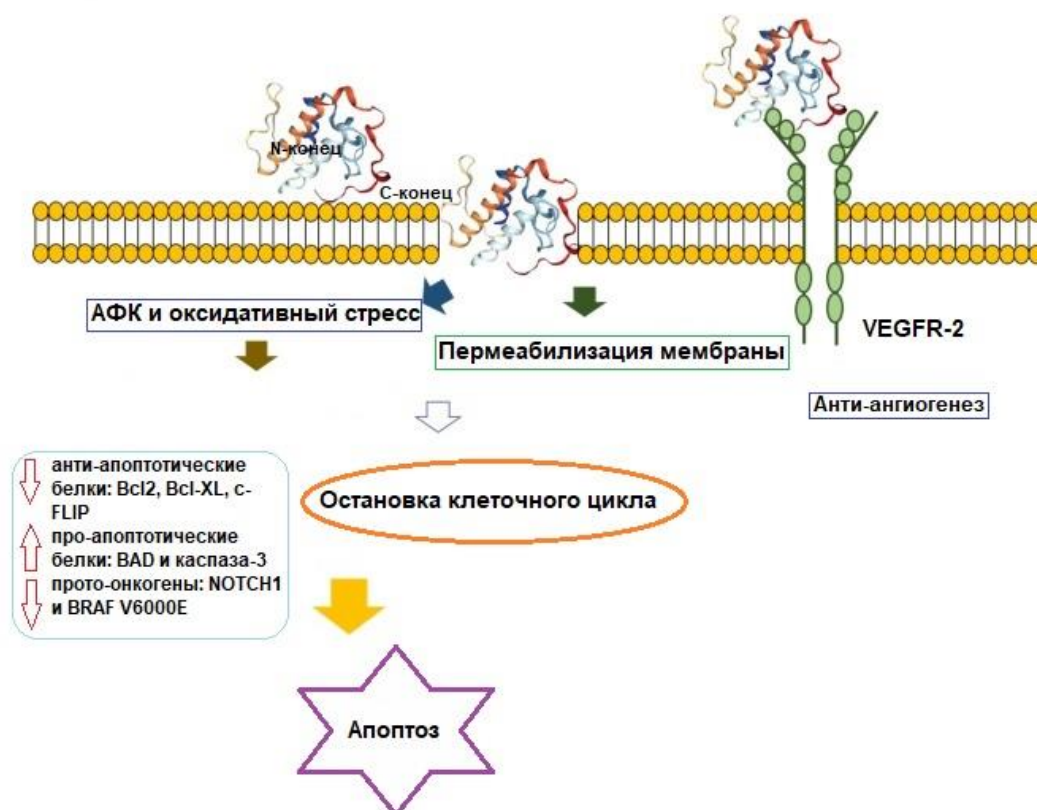
ГПФЛА2 содержится исключительно в ядах гадюк. Она включает 120–125 аминокислотных остатков и семь дисульфидных связей [139]. Однако эта фосфолипаза имеет удлинённый С-конец с другой организацией дисульфидных связей, что четко отличает ГПФЛА2 от ГФЛА2 [143]. В ГПФЛА2 D49 консервативен и вносит вклад в  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую каталитическую активность [144].

ФЛА2 катализирует расщепление сложноэфирной связи фосфолипидов в положении sn2 путем нуклеофильной атаки [145]. Ион кальция, с другой стороны, стабилизирует отрицательно заряженное переходное состояние, координируя фосфатный кислород и карбонильную группу во время катализа [146]. Считается, что ФЛА2 изменяет текучесть мембраны и вызывает ее проницаемость, что в конечном итоге приводит к гибели клеток.

В целом, варианты ФЛА2 из ядов можно разделить на D49 кислую ФЛА2 (Asp49), основную ФЛА2 K49 (присутствие Lys49 вместо Asp49) и S49 ФЛА2 (присутствие Ser49). Основные гомологи ФЛА2, K49 и S49 ФЛА2 ответственны за многие  $\text{Ca}^{2+}$ -независимые виды биологической активности и при этом они каталитически неактивны [144]. Кислая ФЛА2 D49 менее цитотоксична, чем основная ФЛА2 K49, в результате чего она обладает более низкой цитотоксичностью в отношении раковых клеток, чем основная ФЛА2. С другой стороны, варианты S49 ФЛА2 были выделены из ядов чешуйчатых гадюк *Echis sp.* [147], которые также проявляют независимую от  $\text{Ca}^{2+}$  биологическую активность с более сильными цитотоксическими эффектами, чем K49 ФЛА2. Несмотря на это, S49 ФЛА2 демонстрирует более слабую липолитическую активность по сравнению с K49 ФЛА2 [148]. Основные гомологи ФЛА2 проявляют более выраженное цитотоксическое действие в отношении раковых клеток.

С-концевой участок ФЛА2, как полагают, отвечает за нарушение целостности мембраны и взаимодействует с рецептором-2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR-2) [149]. С-концевой участок фермента также

может связываться с VEGFR-2 для ингибирования ангиогенеза, важного процесса при метастазировании рака. Следовательно, цитотоксичность ФЛА2, вероятно, опосредована взаимодействием между С-концевой областью и плазматической мембраной [150]. Кроме того, цитотоксичность, вызванная ФЛА2, может включать высвобождение активных форм кислорода (АФК) во время метаболизма фосфолипидов, что еще больше увеличивает внутриклеточный окислительный стресс (рис.7). Повышенный окислительный стресс приводит к активации сигнальных путей гибели клеток. Хотя точные пути не установлены, они могут включать подавление антиапоптотических белков, таких как Bcl2, Bcl-XL и c-FLIP. Также наблюдается увеличение проапоптотической экспрессии BAD и активация каспазы 3 [151]. Более того, ФЛА2 изменяет распределение различных фаз клеточного цикла, вызывая апоптоз [152].



**Рисунок 7.** Цитотоксические эффекты ФЛА2 на раковые клетки. Пример трехмерной структуры основной ФЛА2 К49 из яда *Bothrops flavoviridis*. С-конец ФЛА2 взаимодействует непосредственно с клеточной мембраной, вызывая эффекты возмущения мембраны. Накопление активных форм кислорода (АФК) происходит из-за каталитического действия ФЛА2 на фосфолипиды мембран, что вызывает гибель клеток.



ФЛА2 снижает экспрессию антиапоптотических белков и протоонкогенов. ФЛА2 увеличивает экспрессию проапоптотических белков BAD и каспазы-3. В то же время ФЛА2 вызывает остановку клеточного цикла в раковых клетках.

ФЛА2 также оказывает генотоксическое действие, вызывая цитотоксичность лимфоцитов человека [153]. Кроме того, ФЛА2 вызывает цитотоксичность за счет повреждения ДНК и образования микроядер. ФЛА2 также значительно улучшает экспрессию генов протоонкогена NOTCH1 и BRAF V600E в клетках SK-MEL-28 [154]. Как показала проточная цитометрия с двойным окрашиванием аннексином V-пропидиум йодидом, апоптоз остается преобладающим механизмом гибели клеток при цитотоксичности, связанной с ФЛА2 [155]. Кроме того, сообщалось, что ФЛА2 обладает противоопухолевыми свойствами *in vivo*. ФЛА2 из *Bothrops jararacussu* - BthTX-1, уменьшала размер опухоли саркомы S180 на 79% у мышей BALB/c [156]. Кроме того, было обнаружено, что Drs-ФЛА2 из *Daboia russelii siamensis* снижает опухолевые узелки на 65% у мышей BALB/c [157]. Пока только кротоксин, ФЛА2 из яда *Crotalus durissus terrificus*, проходит фазу I клинических испытаний, которая показывает объективный частичный ответ у онкологических больных [158].

### 1.2.2 Противовирусная активность змеиных ФЛА2

Вирусы связаны с несколькими эндемическими заболеваниями, включая энтеровирус [159], ВПЧ (вирус папилломы человека) [160], ВИЧ (вирус иммунодефицита человека) [161] и ВПГ (вирус простого герпеса) [162], а также вспышки Эбола вируса, ZIKV (вирус Зика), вирус гриппа, YFV (вирус желтой лихорадки), DENV (вирус денге) и, в настоящее время, SARS-CoV-2 (коронавирус 2, связанный с тяжелым острым респираторным синдромом) [163–167]. Большинство зарегистрированных с 1980 г. вспышек были связаны с вирусными инфекциями [168], которые по-прежнему являются глобальным бременем для общественного здравоохранения и экономики. Кроме этого, из-за своего генетического разнообразия вирусы способны инфицировать

широкий круг хозяев, что может приводить к скачкам между хозяевами после зоонозных контактов [169].

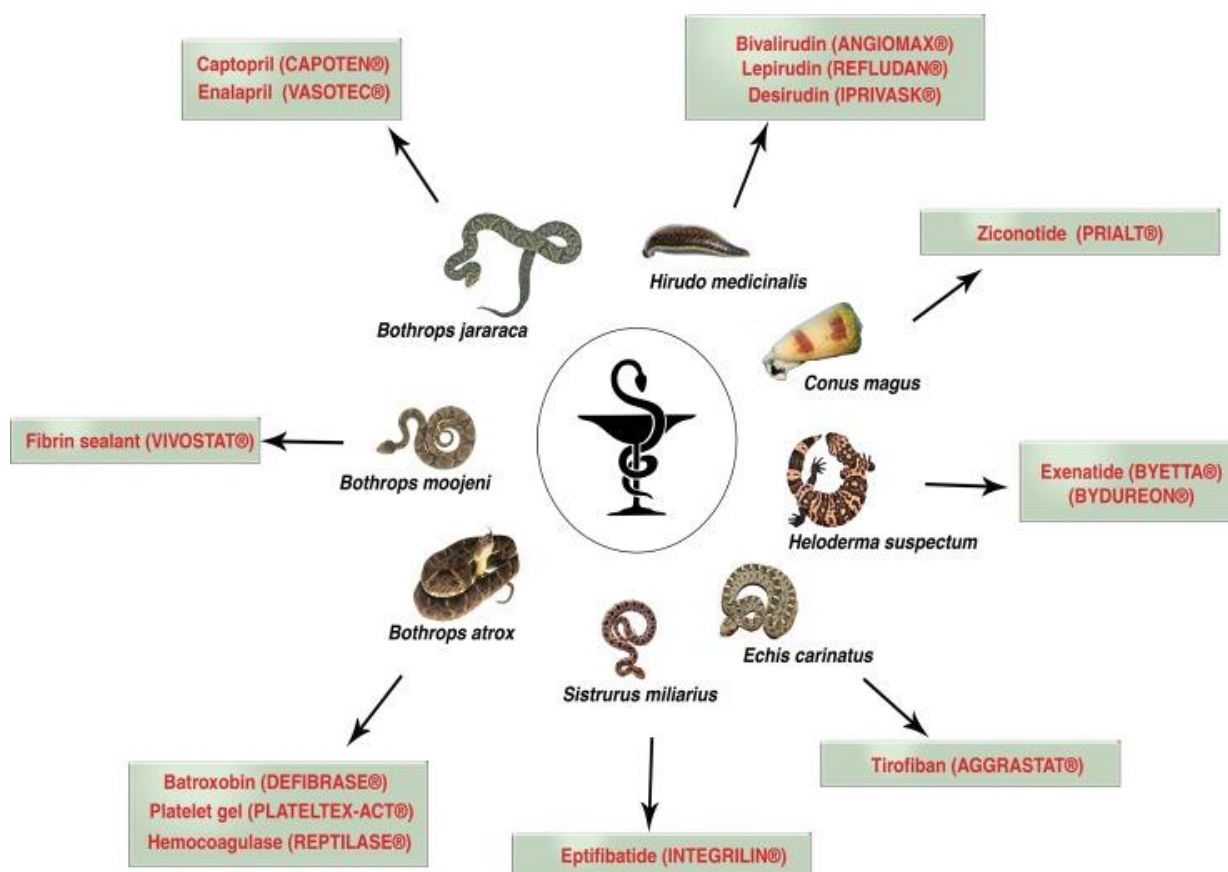
Пандемии, вызываемые вирусами, обычно серьезны и могут уносить до миллиона жизней, как показала пандемия H1N1 в 1918 году [170], «свиной грипп» H1N1 в 2009 году [171] и новая коронавирусная болезнь 2019 года (COVID-19) [172]. Кроме того, за последние десятилетия глобальная заболеваемость вирусом Денге также резко возросла. По оценкам, ежегодно во всем мире регистрируется от 100 до 400 миллионов случаев заболеванием Денге [173].

Как правило, цикл репликации вируса начинается с прикрепления вирусной частицы к специфическим рецепторам на поверхности клеток-хозяев, которые запускают проникновение вируса путем эндоцитоза, слияния мембран (оболочка вируса с мембраной клетки) и прямого проникновения [174]. После интернализации, капсид высвобождается в цитоплазму и освобождает вирусный геном, который реплицируется для создания копий генома вируса и транслируется в вирусные белки. В эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) и комплексе Гольджи происходит сборка и созревание вирусных белков, которые затем направляются на мембрану клетки-хозяина, где происходит высвобождение потомства вирусных частиц [175].

В настоящее время противовирусных препаратов и вакцин недостаточно для борьбы с возникающими и возобновляющимися вирусными заболеваниями [176]. Таким образом, открытие новых противовирусных препаратов является актуальной задачей. В целом, противовирусная терапия - единственный подход к специфическому лечению вирусных инфекций, которая останавливает репликативный цикл вируса [177]. Однако, из-за высокой генетической изменчивости, вирусы могут быстро приобретать устойчивость к противовирусному лечению, особенно РНК-содержащие вирусы [178]. Кроме того, противовирусная терапия и длительное лечение могут вызвать ряд побочных эффектов, включая желудочно-кишечные

расстройства, усталость, головную боль, невропатию и токсичность для печени [179].

Разнообразные соединения, выделенных из природных источников, заложили основу для дальнейшего прогресса в разработке лекарств против различных заболеваний [180]. Среди них некоторые препараты на основе змеиного яда были одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA, США) или участвуют в доклинических или клинических испытаниях для различных терапевтических применений (рис. 8) [181].



**Рисунок 8.** Препараты на основе ядов. [182].

Разработка препаратов на основе змеиного яда началась после открытия брадикинин-потенцирующих пептидов (BPP), выделенных из яда бразильской гадюки (*Bothrops jararaca*), что позволило разработать Каптоприл, который является ингибитором ангиотензин-превращающего фермента и широко применяется при гипертонии [183]. Кроме того, в

клинической практике имеются и другие препараты на основе змеиного яда, такие как Тирофибан и Эптифибатид (антиагреганты) [184,185], Батроксобин, Моодженин и Вивостат (антикоагулянты) [186–189]. В доклинических исследованиях изучаются и другие препараты, в состав которых входят молекулы из змеиного яда в качестве основного действующего вещества [190].

Благодаря такому терапевтическому потенциалу, токсины змеиного яда широко исследуются для открытия новых биоактивных соединений и рассматриваются как альтернативный источник для лечения множества заболеваний, включая опасные для жизни вирусные заболевания [191].

Яд *Crotalus durissus terrificus* (*C. d. Terrificus*), южноамериканской гремучей змеи, состоит из большого количества биологически активных соединений, включая такие как кротоксин, кротамин, ФЛА2 «интер-кро» (ФЛА2-IC), конвульксин и гироксин [192,193]. Кротоксин, составляющий более половины сухой массы яда *C. d. terrificus*, представляет собой гетеродимерный белок, состоящий из ФЛА2-СВ (основной компонент фосфолипазы) и кротапотина (кислый нетоксичный каталитически неактивный белок) [194]. Villarrubia и соавторы [195] показали, что кротоксин оказывает анти-ВИЧ эффект за счет прямого взаимодействия с Gag p24. Более того, Muller и его коллеги [196], работая с различными ФЛА2, выделенными из *C. d. Terrificus*, исследовали различные подходы к раскрытию противовирусной активности, опосредованной кротоксином, ФЛА2-СВ и ФЛА2-IC против DENV-2 и YFV. Авторы продемонстрировали, что все исследованные ФЛА2 способствовали значительному ингибированию проникновения DENV-2 и YFV в клетки Vero E6 путем прямого воздействия на вирусные частицы (вирулицидная активность) и путем вмешательства в этапы адсорбции и интернализации (ранние стадии цикла репликации вируса). Кроме того, исследователи получили представление о роли каталитических центров протестированных ФЛА2, предложив использовать ФЛА2 без каталитической активности (BthTX-I), выделенную из *Bothrops jararacussu*

[197]. BthTX-I показал противовирусную активность против YFV и DENV-2 в тестах на вирулицидную активность, вирусную адсорбцию и интернализацию.

В другом исследовании ФЛА2-СВ и кротоксин ингибировали проникновение вируса за счет вирулицидной активности против других оболочечных вирусов, таких как вирус Rocio (ROCV; семейство *Flaviviridae*), вирус Oropouche (OROV; семейство *Bunyaviridae*) и вирус Mayaro (MAYV; семейство *Togaviridae*). Однако, данные соединения не проявляли вирулицидного действия против вируса Коксаки В5 (CV-B5; семейство *Picornaviridae*; безоболочечный вирус), что позволяет предположить возможное противовирусное действие за счет влияния токсинов на липидную двуслойную вирусную оболочку [198].

При исследовании противовирусного механизма ФЛА2, полученных из яда *C. t. terrificus*, Shimizu и его коллеги [199] установили, что ФЛА2-СВ ингибирует проникновение и репликацию вируса гепатита С (ВГС) штамм JFH-1 в клетках Huh 7.5, а кротоксин блокирует проникновение и высвобождение вируса, предполагая, что эти белки обладают множественными противовирусными эффектами против ВГС. Более того, авторы также сообщили, что ФЛА2-СВ значительно снижает уровни липидных капель, которые необходимы для репликации ВГС, и снижают уровни белка NS5A ВГС, что свидетельствует о том, что помимо действия на проникновение вируса, ФЛА2-СВ способна нарушать репликацию ВГС, вероятно, за счет вмешательства в метаболизм липидов в клетке-хозяине [200].

Как В1К-ФЛА2 (Lys49 sPLA2s), так и В1D-ФЛА2 (Asp49 sPLA2s) представляют собой две основных ФЛА2, выделенных из яда ямочной гадюки *Bothrops leucurus*, обычно встречающейся на северо-востоке Бразилии [201]. Cecili с соавторами [202] показали, что предварительная обработка клеток LLC-MK2 (эпителиальные клетки почек макаки-резус) каждой изоформой В1-ФЛА2 с последующей вирусной инфекцией, была способна подавлять инфекционность DENV (серотипы 1, 2 и 3), измеряемую с помощью вирусной

нагрузки DENV в супернатантах клеток после заражения вирусом. С другой стороны, обработка В1-ФЛА2 после проникновения вируса не способна ингибировать репликацию вируса.

*Bothrops asper* - вид гадюк, обитающий в Центральной Америке, и его яд содержит значительные концентрации кислотных и основных ферментов ФЛА2 [203]. Яд *B. asper* содержит как основную ферментативно активную ФЛА2 (Mt-I), так и каталитически неактивный ФЛА2-подобный белок (Mt-II) [150]. Brenes с соавторами [202] исследовали противовирусный потенциал, вызываемый изоформами Mt-I и Mt-II, выделенными из яда *B. asper*. Авторы показали, что эти ФЛА2 в концентрации 50 мкг/мл полностью блокировали проникновение вируса за счет вирулицидного действия против DENV и YFV, в то время как проявляли умеренное или незначительное действие против других оболочечных вирусов (ВПГ-1, ВПГ- 2, вирус гриппа H3N2 и везикулярный стоматит) или вирусов без оболочки (полиовирус Сэбина 1, 2 и 3). Эти данные показали, что химическая инактивация Mt-I приводит к снижению вирулицидной активности, что указывает на важную роль ферментативного действия против вирусной инфекции.

### 1.3 Заключение

Имеющиеся в настоящее время данные свидетельствуют о том, что холинергическая система в иммунных клетках вносит решающий вклад в регуляцию нейроиммунных взаимодействий. Холинергический противовоспалительный путь - это путь, где происходит взаимодействие нервной и иммунной системы, а одним из главных участников являются  $\alpha 7$  никотиновые ацетилхолиновые рецепторы. Холинергические сигналы, генерируемые иммунными клетками, по-видимому, являются триггерами как иницирования, так и прекращения синтеза цитокинов (например, IL-2 в Т-клетках и TNF- $\alpha$  в макрофагах). Кроме того, имеющиеся данные свидетельствуют о том, что иммунная система может модулироваться путем

регуляции холинергической активности иммунных клеток. Активация  $\alpha 7$  nAHR способствует значительной защите от продукции цитокинов и снижению токсичности в моделях воспаления на животных. Активность  $\alpha 7$  рецепторов на макрофагах и других цитокин-секретирующих клетках - это новая и быстро расширяющаяся область исследований, в которой начинают выявляться механизмы, касающиеся сборки, экспрессии и функции  $\alpha 7$  рецептора в холинергическом противовоспалительном пути. Таким образом, более полное понимание роли холинергической системы в иммунных клетках может быть полезно для разработки лекарств и терапевтических стратегий для лечения различных заболеваний, связанных с воспалением, а также раком. Предстоящие исследования дадут дополнительную информацию о биологической роли  $\alpha 7$  рецепторов и о том, можно ли использовать эти знания для разработки будущих терапевтических средств для лечения воспалительных заболеваний под контролем холинергического противовоспалительного пути.

$\alpha$ -Нейротоксины - это белки змеиного яда, служащие точными инструментами в исследованиях nAHR. Их ценная особенность - способность различать определенные подтипы nAHR. Интерес к нейротоксинам в последние годы активизировался открытием того, что некоторые, так называемые белки Lуб, как и  $\alpha$ -нейротоксины, также имеют трехпетельную структуру и присутствуют в широком спектре организмов от дрозофилы до человека, взаимодействуют с nAHR и являются эндогенными регуляторами физиологических и патофизиологических функций. Семейство белков яда змей также включает и токсины с ферментативной активностью, среди которых находятся фосфолипазы A2. Эти ферменты представляют собой многофункциональные белки, которые взаимодействуют с различными белками-мишенями, регулируя их функции, необходимые для жизненных процессов, включая передачу нейрональных или нервно-мышечных сигналов. Несмотря на обширные исследования ФЛА2, лишь немногие из них

посвящены аспектам противовирусной активности и цитотоксичности. Необходимы дальнейшие исследования для подтверждения противовирусных эффектов ФЛА2, чтобы изучить их безопасность, токсичность и механизмы действия. Взятые вместе, новые структурные и функциональные исследования ФЛА2 необходимы для обнаружения новых релевантных мотивов, ответственных за противовирусную активность, которые позволят в будущем использовать эти белки или пептиды для разработки противовирусных препаратов, способных обеспечить большую стабильность и целенаправленное действие.

Таким образом, настоящая работа посвящена применению представителей двух основных классов соединений – агонистов и антагонистов nAChR (в том числе природных и модифицированных  $\alpha$ -нейротоксинов) и фосфолипаз A2 из змеиного яда, для выяснения механизмов противовоспалительной активности  $\alpha 7$  никотинового ацетилхолинового рецептора и поиска путей ингибирования репликации возбудителей COVID-19 и ВИЧ.

## **2 Материалы и методы**

В исследовании принимали участие здоровые добровольцы, давшие свое предварительное письменное согласие на участие в исследовании.

Эксперименты проводились на 10–12-недельных самцах мышей линии C57BL. Все эксперименты были одобрены институтской комиссией по содержанию и использованию лабораторных животных (ИБХ РАН). Были приложены все усилия, чтобы минимизировать количество используемых животных и их страдания.



## 2.1. Материалы

### 2.1.1. Клеточные линии

В работе были использованы следующие клеточные линии, полученные из АТСС:

1) суспензионные: МТ-4 (Т-клеточная лейкемия), Н9 (Т-клеточная лимфома), Sup-T1 (Т-лимфобластная лимфома), ССRF-СЕМ (острая лимфобластоидная лейкемия), ТНР-1 (острая моноцитарная лейкемия).

2) адгезионные: МCF-7, ВТ-474, SK-BR-3 (аденокарциномы молочной железы), РС-3, LNCaP (аденокарциномы простаты), А549 (аденокарцинома легких), Vero E6 (почка мартышки), 293Т (эмбриональная почка человека), 293Т/ACE2 (стабильная экспрессия человеческого ACE2; получена нами ранее [204]), MDBK (почка быка), НК-2 (почка человека), TZM-bl (клон клеток HeLa, экспрессирующий CD4/CXCR4/CCR5 и tat-зависимые гены люциферазы и  $\beta$ -галактозидазы).

### 2.1.2. Вирусы

В экспериментах использовали следующие референс-штаммы ВИЧ-1: ВИЧ-1 Bru (Lai), ВИЧ-1 ПИВ и ВИЧ-1 RF; лабораторные высокопатогенные штаммы: ВИЧ-1 U455, ВИЧ-1 MvP-899 и ВИЧ-2 ЕНО (AIDS Reagent program, США). Штамм ВИЧ-1 Zmb был изолирован ранее в лаборатории иммунохимии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. Пандемические штаммы SARS-CoV-2, изолированные из секрета носоглотки от больных COVID-19: hCoV-19/Russia/Moscow\_PMV-4 (GISAID ID: EPI\_ISL\_470898), hCoV-19/Russia/Moscow\_PMV-18 (GISAID ID: EPI\_ISL\_872633) и hCoV-19/Russia/Moscow\_PMV-20 (GISAID ID: EPI\_ISL\_872634) также в НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. Бычий коронавирус (BCV; Государственная коллекция вирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи). Эксперименты с вирусами проводились в лабораториях, имеющих лицензию для работы с ВИЧ и пандемическими

штаммами коронавируса, в условиях для работы с микроорганизмами II группы патогенности, регламентированные санитарными правилами СП 1.3.3118-13.

### 2.1.3. Растворы и реагенты

Буфер PBS (Gibco, США), GlutaMAX (Gibco, США), раствор антибиотиков пенициллин-стрептомицин (Gibco, США), эмбриональная телячья сыворотка (FBS; Gibco, США), внеклеточный буфер (140 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.8 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM HEPES, 10 mM glucose; pH 7.4), буфер для окрашивания клеток (PBS содержащий 0.5% бычьего сывороточного альбумина (BSA) и 0.01% азиды натрия), внутренний раствор для электрофизиологии (140 mM CsCl, 6 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM MgATP, 0.4 mM NaGTP, 10 mM HEPES/CsOH, 20 mM BAPTA/KOH; pH 7.3), NaCl среда (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM глюкоза, 0.1% БСА, and 10 mM HEPES, pH 7.5) и MgCl<sub>2</sub> среда аналогичного состава и содержащая 20 mM MgCl<sub>2</sub>, раствор для аннексина (100 mM HEPES, 8,1 г NaCl, 278 г CaCl<sub>2</sub> на 1000 мл деионизированной воды), среда RPMI 1640 (Gibco, США), среда DMEM (Gibco, США), раствор трипсин-ЭДТА (Gibco, США), среда FluoroBrite DMEM (Gibco, США).

LPS (Липополисахарид *Escherichia coli* O111:B4), форбол 12-миристат 13-ацетат (PMA) и поли-L-лизин гидрохлорид были получены из Sigma, США. Fluor-4AM, пробенецид, человеческий гранулоцит-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF),  $\alpha$ -бунгаротоксин Alexa Fluor 647 и  $\alpha$ -бунгаротоксин Alexa Fluor 555 были получены из ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, США). Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare; Pittsburgh, PA, США), интерферон- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ; PeproTech, Rocky Hill, NJ, США), аннексин V-APC и пропидия иодид (PI) (Biolegend, San Diego, CA, США), 5-бромо-2-дезоксинуридин (BrdU; Sigma, США), этидия бромид (EtBr, Sigma, США), аденозинтрифосфат (АТФ; Sigma, США), тиазолиловый синий тетразолий

бромид (МТТ, ПанЭко, Россия), диметилсульфоксид (ДМСО; ПанЭко, Россия), YO-PRO-1 иодид (ThermoFisher Scientific; Waltham, MA, США). PNU 282987, PNU 120596, A839977, никотин (Nic), ( $\pm$ )-эпибатидин (Epi), метилликаконитин цитрат (MLA), дигидро- $\beta$ -эритроидин гидробромид (Dh $\beta$ E), ацетилхолин (Ach), тубокурарин и  $\alpha$ -бунгаротоксин ( $\alpha$ -bgt) были получены из Tocris (R&D Systems, Minneapolis, MN, США).

#### 2.1.4. Антитела

anti-HLA-DR-FITC (клон LN3), anti-CD14-PE (клон HCD14), anti-CD54-Alexa Fluor 488 (клон HCD54), anti-CD11b-PE/Cy7 (клон ICRF44), anti-Ki-67-PE (клон Ki-67) и anti-BrdU-FITC (клон 3D4) были получены из Sony Biotechnology (San Jose, CA, США). anti-Fc $\epsilon$ RI-Alexa Fluor 647 (клон MAR-1) и anti-CD117 (c-kit)-APC/Cy7 (клон 2B8) были получены из BioLegend, San Diego, CA, США. Anti-ACE2-PE (клон 535919; R&D Systems, США), goat anti-human Fc DyLight 650 (ThermoFisher Scientific; Waltham, MA, США).

#### 2.1.5. Змеиные фосфолипазы А2 (ФЛА2)

Фосфолипазу А2 II (BF-PLA2-II, GenBank AAK62361.1) и фосфолипазу А2 I (BF-PLA2-1, UniProtKB Q90WA7) очищали из яда *Bungarus fasciatus*. Фосфолипаза А2 Vur-PL2 (UniProtKB F8QB) была очищена из яда гадюки *V. ursinii renardi*. Димерные фосфолипазы HDP-1 и HDP-2 были выделены из яда гадюки *V. nikolskii* и разделены на субъединицы HDP-1P (UniProtKB Q1RP79), HDP-2P (UniProtKB Q1RP78) и HDP-1I (UniProtKB A4VBF0). Выделение всех перечисленных фосфолипаз было проведено в Лаборатории молекулярной токсикологии ИБХ РАН.

## 2.2. Методы

### 2.2.1. Получение человеческих макрофагов, их стимуляция и исследование экспрессии nAHR

#### *Культивирование клеточных линий*

Суспензионные и адгезивные клеточные линии культивировали в полной ростовой среде RPMI 1640 и DMEM, соответственно. Среды были дополнены 10% FBS, 1× GlutaMAX и 1× раствором пенициллина-стрептомицина. Для открепления адгезивных культур использовали раствор Трипсин-ЭДТА.

#### *Получение человеческих макрофагов и их стимуляция агонистами nAHR*

Венозную кровь от здоровых доноров собирали в вакутайнеры КЗ-ЭДТА. Затем кровь была разбавлена PBS 1:1. Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) получали центрифугированием в градиенте плотности Ficoll-Paque PLUS. Кольцо PBMC помещали в стерильную чашку Петри и инкубировали при 37°C в течение 2 часов. Затем неприкрепленные клетки удаляли промыванием PBS и заменой свежей полной средой RPMI 1640. Для дифференцировки макрофагов, происходящих из моноцитов (MDM), к выделенным моноцитам добавляли 50 нг/мл GM-CSF и культивировали в течение 6 дней для их созревания в неполяризованные MDM.

Моноцитарную клеточную линию THP-1 дифференцировали в макрофаги путем 24-часовой инкубации со 100 нМ PMA, с последующей 48-часовой инкубацией в полной среде RPMI 1640. M1 (классическая) поляризация была достигнута добавлением IFN- $\gamma$  (20 нг/мл) и LPS *E.coli* (100 нг/мл) в течение 48 часов.

Для экспериментов макрофаги ТНР-1 (ТНР-1Мф и ТНР-1М1) или человеческие МДМ культивировали в 12-луночных планшетах в количестве  $5 \times 10^5$  клеток/луночку. Стимуляцию нАХР проводили обработкой клеток с помощью PNU 282987 (1  $\mu\text{M}$ ), а для ингибирования использовали  $\alpha$ -бунгаротоксин (10  $\mu\text{M}$ ) в течение 48 часов.

#### *Ca<sup>2+</sup> имиджинг единичных клеток*

Макрофаги ТНР-1Мф высаживали на покровные стекла, покрытые поли-L-лизином, и инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Далее клетки инкубировали с Fluo-4АМ в концентрации 2 мМ и пробенецидом, ингибитором переносчика органических анионов, в концентрации 1,25 мМ в течение 1 ч при комнатной температуре. После инкубации, клетки промывали внеклеточным буфером три раза. К клеткам добавляли 10  $\mu\text{M}$  PNU 120596 (положительный аллостерический модулятор  $\alpha 7$  нАХР), после чего загруженный в клетки Fluo-4 возбуждали при 485 нм и регистрировали флуоресценцию при 535 нм. Измерения проводили на эпифлуоресцентном микроскопе Olympus (Япония) с использованием САМ-ХМ10. Программное обеспечение Cella Imaging (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Германия) использовалось для записи видео. Видео анализировали с помощью программы ImageJ. PNU 282987 (1  $\mu\text{M}$ ) апплицировали непосредственно на клетки. Ингибирование  $\alpha 7$  нАХР достигалось применением 10  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -бунгаротоксина за 5 минут до добавления агониста PNU 282987. Рост концентрации кальция в клетках измеряли относительно базового уровня флуоресценции каждой клетки.

#### *Проточная цитометрия*

Для исследования экспрессии поверхностных маркеров в макрофагах ТНР-1 или МДМ, после стимуляции  $\alpha 7$  нАХР, использовали следующие антитела: HLA-DR-FITC, CD14-PE, CD54-Alexa Fluor 488 и CD11b-PE/Cy7. Клетки прикрепляли раствором для диссоциации и окрашивали флуоресцентно

мечеными антителами в течение 30 мин на льду в буфере для окрашивания. Образцы отмывали два раза буфером для окрашивания с помощью центрифугирования при 1200 об/мин в течение 7 мин при 4°C и анализировали с помощью проточного цитометра FACSCalibur (BD Biosciences, Калифорния, США), оснащенного лазерами с длиной волны 488 и 640 нм. В каждом образце измеряли не менее 100000 событий в регионе живых клеток. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения FlowJo 10.0.8. (Three Star Inc., Орегон, США).

#### *Окрашивание клеток флуоресцентным $\alpha$ -бунгаротоксином*

Для оценки экспрессии  $\alpha 7$  nAChR на мембранах макрофагов THP-1 и MDM, клетки открепляли раствором для диссоциации и окрашивали 100 нМ  $\alpha$ -бунгаротоксина, меченного Alexa Fluor 647, в буфере для окрашивания клеток при комнатной температуре в течение 1 ч. После этого клетки дважды промывали буфером для окрашивания и анализировали с помощью проточного цитометра BD FACSCalibur. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения FlowJo 10.0.8. Автофлуоресценцию макрофагов THP-1 и MDM вычитали из значений интенсивности флуоресценции окрашенных образцов.

Для цитохимического окрашивания MDM, клетки высевали на покровные стекла, обработанные поли-L-лизинном в среде FluoroBrite DMEM и окрашивали  $\alpha$ -бунгаротоксином Alexa Fluor-555 (100 нМ) в течение 30 мин при 37°C. Стекла промывали, фиксировали в забуференном 4% параформальдегиде, покрывали глицерином с карбонатным буфером и исследовали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Olympus (Япония) с устройством CAM-XM10 и оснащенным соответствующими наборами фильтров. Изображения анализировали с помощью программы ImageJ (НИН, США).

### *Электрофизиология*

Макрофаги THP-1 или MDM высаживали на покровные стекла и переносили во внеклеточный раствор. Локальную фиксацию потенциала клеток выполняли с использованием усилителя НЕКА (НЕКА Elektronik, Германия). Капилляры были изготовлены с помощью Narishige и заполнялись внутренним раствором. Микроэлектроды имели сопротивление 6-8 МОм, наблюдаемое в реальном времени с помощью испытательного импульса 5 мВ 5 мс, клетки были зафиксированы на уровне  $-40$  мВ с использованием некомпенсированной быстрой емкости и фильтра 10 кГц. PNU 282987 (1  $\mu$ М) и/или никотин (10  $\mu$ М) апплицировали непосредственно на клетки. PNU 120596 апплицировали через Fast Step (Warner Instrument, США) при скорости потока около 1 мл/мин. Токи контролировались и анализировались с помощью программного обеспечения Patchmaster (НЕКА Elektronik, Германия).

### *Иммуноферментный анализ (ИФА)*

После дифференцировки моноцитарной линии THP-1 в макрофаги, клетки отмывали и переносили в свежую полную среду RPMI 1640, содержащую различные концентрации PNU 282987 (0.1-10  $\mu$ М). Для индукции воспаления *in vitro*, LPS *E.coli* (500 мкг/мл) добавляли к макрофагам THP-1. PNU 282987 добавляли за 30 мин до обработки клеток с помощью LPS. Супернатанты собирали через 24 ч после обработки клеток и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  для дальнейшего анализа. Количественное определение TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-10, высвобожденных из макрофагов THP-1 в культуральную среду, производили с помощью наборов для ИФА в соответствии с инструкциями производителя (Вектор-Бест, Россия).

*Количественная полимеразная цепная реакция (qПЦР) в режиме «реального времени»*

Тотальную РНК выделяли из макрофагов THP-1 и MDM с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Синтез первой цепи комплементарной ДНК (кДНК) проводили с использованием набора Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit с дцДНКазой (ThermoFisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя, используя термоциклер (BioRad, США). Реакция проводилась при 37°C - 2 мин, 25°C - 10 мин, 50°C - 30 мин и 85°C - 5 мин. кДНК подвергали ОТ-ПЦР (обратная транскрипция) в режиме «реального времени» с использованием термоциклера CFX96 (Bio-Rad, США) и PowerUP SYBR Green Master Mix (ThermoFisher Scientific, США) при следующих условиях: 95°C - 3 мин, 95°C - 15 с, 55°C - 15 с, 72°C - 20 с (40 циклов). После завершения ПЦР, специфичность продуктов реакции подтверждали анализом кривой плавления. Количественную оценку экспрессии мРНК субъединиц nАХР выполняли путем нормализации значений  $C_t$  (порогового значения цикла) каждого образца относительно гена человеческого  $\beta$ -актина. Последовательности использованных праймеров для ПЦР приведены в Приложении 1.

**2.2.2. Оценка открытия больших пор рецептора P2X7, с помощью АТФ, под действием лигандов nАХР**

*Выделение мышинных тучных клеток и их идентификация*

Перитонеальные мышинные тучные клетки выделяли по следующей методике. Мышей C57BL анестезировали ингаляцией CO<sub>2</sub> и умерщвляли цервикальной дислокацией шейных позвонков. С помощью шприца объемом 10 мл, в брюшную полость вводили 3 мл PBS и 2 мл воздуха. Затем, лаваж из брюшной полости собирали в пробирку и фильтровали через фильтры с размером пор 100 мкм (Sysmex CellTrics, Германия). В полученную суспензию



клеток добавляли 2% FBS. Процедуры выполнялись с использованием ледяных растворов и все следующие шаги проводились при 4°C для улучшения выживаемости тучных клеток и снижения исходного уровня активации. Собранную суспензию клеток центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин при 4°C. Осадок клеток ресуспендировали в PBS.

#### *Идентификация тучных клеток*

Тучные клетки идентифицировали с помощью проточной цитометрии. Свежевыделенные перитонеальные клетки окрашивали моноклональными антителами - FcεRI-Alexa Fluor® 647 и CD117 (c-kit)-APC/Cy7. Протокол окрашивания проводился в соответствии с рекомендациями производителя. Образцы окрашивали в течение 15 мин на льду в темноте, промывали PBS с добавлением 2% FBS и ресуспендировали в 300 мкл PBS. Жизнеспособность клеток определяли с помощью 7-AAD (7-Аминоактиномицин D; BD Biosciences, Калифорния, США). Данные были получены с использованием проточного цитометра CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Тучные клетки идентифицировали по двойной положительной экспрессии FcεRI и CD117.

#### *Стимуляция тучных клеток с помощью LPS*

Выделенные перитонеальные клетки центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин, после чего осадок клеток ресуспендировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% FBS. Стимуляцию проводили обработкой клеток LPS *E.coli* (1 мкг/мл) в течение 5 ч при 37°C. Затем, клетки промывали один раз и в дальнейшем использовали для стимуляции АТФ и оценки открытия рецептора P2X7 с помощью проточной цитометрии.

*Исследование активации P2X7 рецепторов на тучных клетках и макрофагах*

Для оценки активации рецепторов P2X7 в перитонеальных тучных клетках, производилась их обработка с помощью АТФ отдельно или в присутствии ацетилхолина или никотина. Открытие пор P2X7 рецептора оценивали с помощью флуоресцентного красителя YO-PRO-1. К образцам на 10 мин добавляли ацетилхолин в конечной концентрации (250  $\mu\text{M}$ ), никотин (100  $\mu\text{M}$ ) или антагонист P2X7 A839977 (5  $\mu\text{M}$ ) или PBS с последующим добавлением: 1 или 5 mM АТФ или PBS. После 10 или 20 мин инкубации добавляли YO-PRO1 в конечной концентрации 1  $\mu\text{M}$ . Этот же протокол выполнялся в присутствии 50  $\mu\text{M}$  тубокурарина. Большинство процедур проводились на льду. Образцы анализировали на проточном цитометре CytoFLEX S (Beckman Coulter, США) В каждом образце было проанализировано  $2035 \pm 81$  тучных клеток. Жизнеспособность клеток в популяции тучных клеток составила  $89,8 \pm 1,18\%$ . Данные представлены в виде процента YO-PRO-1-положительных клеток.

В макрофагах человека (MDM) открытие поры P2X7 рецепторов исследовалось с помощью следующей методики. MDM ресуспендировали в среде NaCl и инкубировали с 20  $\mu\text{M}$  EtBr в присутствии АТФ в течение 20 мин при 37°C. Чтобы оценить влияние холинергических агентов на АТФ-индуцированное поглощение этидия, клетки предварительно инкубировали со 100  $\mu\text{M}$  никотина или 250  $\mu\text{M}$  ацетилхолина в течение 10 мин при 37°C. Инкубацию останавливали добавлением равного объема ледяного раствора NaCl, содержащего 20 mM MgCl<sub>2</sub>, с последующим центрифугированием (1500 об/мин в течение 5 мин). Клетки промывали один раз средой NaCl и анализировали с помощью проточного цитометра MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Германия).

### 2.2.3. Исследование цитотоксических свойств змеиных ФЛА2

#### *Фракционирование змеиного яда*

Неочищенный яд крайта *B. fasciatus* разделяли гель-фильтрацией на колонке Superdex 75 10/300 GL (1 × 30 см; GE Healthcare; Пенсильвания, США), уравновешенной 0,1 М ацетатно-аммониевым буфером (рН 6.2). Колонку элюировали при скорости потока 0,5 мл/мин, и элюат контролировали путем измерения оптической плотности при 226 нм. Полученные фракции высушивали. Фракцию 3 дополнительно разделяли обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией на колонке Jupiter C18 (10 × 250 мм) в градиенте 25-40% ацетонитрила в течение 75 мин в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты, при скорости потока 2,0 мл/мин. Элюат контролировали путем измерения оптической плотности при 275 нм. Полученные фракции лиофилизировали.

#### *Модификация ФЛА2*

4-Бромфенацилбромид (Lancaster, England) добавляли в конечной концентрации 200  $\mu\text{M}$  к 20  $\mu\text{M}$  раствору ФЛА2 в 50 mM трис-HCl буфере (рН 7.5), содержащем 10 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Смесь инкубировали 6 ч при комнатной температуре и разделяли с использованием колонки Jupiter C18 HPLC (Phenomenex) и градиента ацетонитрила от 20 до 50% в течение 30 мин в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты. Фосфолиполитическую активность измеряли с использованием синтетического флуоресцентного субстрата 1-пальмитоил-2-(10-пиренилдеcanoил)-sn-глицеро-3-фосфохолина (Molecular Probes, Нидерланды) и спектрофлуориметра Hitachi F-4000.

#### *Оценка жизнеспособности клеток с помощью МТТ теста*

Жизнеспособность клеток исследовали с помощью колориметрического МТТ [3- (4, 5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тейразолия бромид]

теста. Для этого, за сутки до эксперимента клеточные линии (MCF-7, A549, BT-474, Sk-Bv-3, PC3, LNCaP) высевали из расчета  $1 \times 10^4$  клеток/лунку в 96-луночные планшеты. Клетки обрабатывали 1, 10, 50 и 100 мкг/мл сырого яда и различными фракциями или 1, 5 и 10 мкг/мл цисплатина (Sigma, США) в течение 24, 48 или 72 ч, после чего в лунки добавляли раствор МТТ (10 мкг/мл) и дополнительно инкубировали в течение 4 ч. Супернатант декантировали, а образовавшиеся фиолетовые кристаллы формазана растворяли в ДМС. Значение оптической плотности измеряли при 570 нм с использованием 96-луночного планшета-ридера SpectraMax-190 (Molecular Devices, Калифорния, США). Процент жизнеспособных клеток определяли по сравнению с необработанным контролем.

#### *Морфологические исследования клеток*

Клетки MCF-7 и A549 засевали в планшеты и обрабатывали ядом или его фракциями, как описано в предыдущем разделе. Изменения морфологии клеток оценивали с помощью фазово-контрастной микроскопии с использованием микроскопа Zeiss Axio Vert 25C (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия).

#### *Исследование клеточной пролиферации*

Для оценки пролиферации клеток MCF-7, обработанных фракциями змеиного яда, проводили цитометрический анализ с использованием anti-Ki-67-PE. Для внутриклеточного окрашивания, клетки собирали и дважды промывали ледяным PBS, ресуспендировали в холодном 70% этаноле и инкубировали при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 1 ч. Затем, клетки дважды промывали буфером для окрашивания клеток и инкубировали с anti-Ki-67 при комнатной температуре в течение 30 мин. Образцы анализировали с помощью проточного цитометра BD FACSCalibur (BD Biosciences, Калифорния, США).

### *Исследование клеточного апоптоза и некроза*

Клетки MCF-7 высевали при плотности  $2,5 \times 10^5$  клеток/лунку 12-луночного планшета и инкубировали в течение ночи. Затем, клетки обрабатывали ФЛА2 (фракция 3.3) при различных концентрациях в течение 24 ч. После обработки, клетки дважды промывали PBS, ресуспендировали в буфере для аннексина, содержащем аннексин-V-APC и пропидия иодид (PI), инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре и анализировали с помощью проточного цитометра BD FACSCalibur.

#### **2.2.4. Исследование анти-ВИЧ и анти-SARS-CoV-2 активностей ФЛА2**

##### *Культивирование вирусов и получение хронически-инфицированных ВИЧ-1 клеток*

Первичные изоляты SARS-CoV-2 выделяли из секретов носоглотки от больных COVID-19 на клетках Vero E6. Для адаптации SARS-CoV-2 к клеткам, делали три последовательных пассажа, после чего производили накопление вируса на клетках Vero E6 в T25 культуральных флаконах. Стоки вирусов ВИЧ-1 ШВ, ВИЧ-1 RF, ВИЧ-1 Zmb, ВИЧ-1 U455 и ВИЧ-2 ЕНО получали в результате острой инфекции клеток MT-4. Сток вируса ВИЧ-1 Bru (Lai) был получен при инфицировании клеток CCRF-CEM. Вирусы аликвотировали и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Инфекционную активность определяли с помощью метода предельных разведений, с последующим определением титра вируса по методу Reed and Muench [205].

Для получения хронически-инфицированных ВИЧ-1 клеточных линий, клетки MT-4 и CCRF-CEM инфицировали вирусами ВИЧ-1 ШВ или ВИЧ-1 RF, а также ВИЧ-1 Bru (Lai). Клетки культивировали в течение одного месяца. После прекращения острой инфекции, выжившие клетки проверяли на

хроническую продукцию ВИЧ-1 с использованием ИФА р24 ВИЧ-1 (ВекторБест, Россия). Хронически-инфицированные клетки в дальнейшем были обозначены как МТ-4/ВИЧ-1 ПИВ, МТ-4/ВИЧ-1 RF и СЕМ/ВИЧ-1 Bru (Lai).

#### *Исследование анти-ВИЧ активности*

Клетки МТ-4 ( $2 \times 10^4$ /лунку) высевали в 96-луночный планшет. Затем, суспензию клеток смешивали с соответствующими разведениями ФЛА2 (конечные концентрации 100, 10, 1, 0,1, 0,01 и 0,001 мкг/мл) и инфицировали соответствующим штаммом ВИЧ-1 или ВИЧ-2 при  $100\text{TCID}_{50}$ . Через 5 дней жизнеспособность неинфицированных, обработанных ФЛА2 и ВИЧ-инфицированных клеток исследовали спектрофотометрически с помощью метода МТТ. 50% ингибирующая концентрация ( $\text{IC}_{50}$ ), необходимая для предотвращения ВИЧ-индуцированного цитопатического эффекта (CPE), была определена с помощью регрессионного анализа с использованием GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., Калифорния, США).

#### *Анализ синцитиеобразования*

Анализ проводили путем совместного культивирования равных количеств ( $8 \times 10^4$ ) хронически-инфицированных клеток Н9/ВИЧ-1 ПИВ, Н9/ВИЧ-1 RF или СЕМ/ВИЧ-1 Bru с клетками Sup-T1 в 96-луночном планшете, содержащем различные концентрации ФЛА2. Через 24 ч совместного культивирования образование синцитиев оценивали визуально под микроскопом.

#### *Вирулицидная активность против ВИЧ-1*

Сток инфекционного ВИЧ-1 ПИВ смешивали с различными концентрациями ФЛА2 и инкубировали в течение 1 ч при  $37^\circ\text{C}$ . Затем, образцы разбавляли в 5000 раз полной средой RPMI 1640 для достижения концентрации ФЛА2 ниже  $\text{IC}_{50}$ . Инфекционность ВИЧ-1 ПИВ определяли с

помощью титрования вируса на клетках MT-4. Через 5 дней CPE оценивали визуально под микроскопом, и рассчитывали значение  $CCID_{50}$  использованием метода Reed and Muench [205].

*Конструирование и получение env-функциональных и молекулярных инфекционных клонов ВИЧ-1*

Вирусную РНК выделяли из образцов сыворотки от ВИЧ-инфицированных пациентов. Первоначально РНК была амплифицирована с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и секвенирована по фрагментам протеазы и обратной транскриптазы генома ВИЧ-1. Вирусы подтипов А6, В и CRF02\_AG/A<sub>FSU</sub> были отобраны для амплификации и клонирования генома оболочки ВИЧ-1 (env). Амплифицированные фрагменты полноразмерного гена env экстрагировали из агарозного геля с помощью набора для экстракции из геля MinElute (Qiagen, Калифорния) в соответствии с инструкциями производителя. ДНК использовали для лигирования в вектор для экспрессии pcDNA3.1/V5-His-TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Env-псевдовirusы получали путем трансфекции клеток 293Т ( $5 \times 10^6$  клеток в 10 мл ростовой среды в чашке Петри 100 мм) 4 мкг плазмиды с rev/env и 8 мкг env-дефицитного вектора ВИЧ-1 (pSG3Δenv), используя Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США). Через 48 ч супернатант, содержащий псевдовirus, собирали, фильтровали (0,45 мкм) и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  в аликвотах объемом 1 мл. Стоки псевдовirusов титровали с использованием клеток TZM-bl. Для этого, клетки TZM-bl высевали в 96-луночный планшет и инфицировали 10-кратными серийными разведениями вирусов. Через 48 ч вирусной инфекции клетки фиксировали 0,1% параформальдегидом в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем, клетки трижды промывали PBS и окрашивали раствором, содержащим 400 мкг/мл X-gal (5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактопиранозид), 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 4 mM калия ферроцианида и 4 mM

феррицианида калия в PBS в течение 2 ч при 37°C. Окрашенные синие клетки визуализировали и подсчитывали под микроскопом.

Инфекционные молекулярные клоны ВИЧ-1 K3016 и AD8 получали путем трансфекции плазмидами в клетки 293Т. Инфекционная активность вирусов оценивалась с использованием клеток TZM-bl.

#### *Анализ ингибирования ВИЧ-1 env-псевдовирuсов*

Анализ ингибирования с определением ферментативной активности β-галактозидазы выполняли с использованием репортерных клеток TZM-bl. Для этого, клетки TZM-bl высевали в 96-луночные планшеты (10<sup>4</sup>/лунку) за день до эксперимента. Затем, различные концентрации ФЛА2 добавляли к клеткам, после чего производили инокуляцию ВИЧ-1 псевдовирuсами при 500 BFU/лунку (blue cell-forming units). После 48 ч инокуляции ВИЧ-1, клетки лизировали PBS содержащим 1% Triton-X100, и инкубировали при 37°C в течение 1 ч со 10 mM хлорфеноловым красным b-D-галактопиранозидом (CPRG; Sigma, США) в 2 mM MgCl<sub>2</sub> и 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Реакцию останавливали добавлением 0.5M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Оптическую плотность (при длине волны 570 нм) измеряли на считывающем устройстве для микропланшетов (Hidex Sense Beta Plus, Hidex, Turku, Финляндия).

#### *Анализ ингибирования вирусной адсорбции ВИЧ-1*

Для постановки эксперимента, клетки MT-4 высевали в лунки 24-луночного планшета в концентрации 1×10<sup>6</sup>/мл в полной ростовой среде RPMI-1640. Затем, к клеткам добавляли различные концентрации ФЛА2, после чего производили инокуляцию клеток штаммом ВИЧ-1 ПИВ при 1000TCID<sub>50</sub>. Адсорбция вируса протекала в течение часа при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Далее, клетки отмывали от резидуального вируса с помощью PBS и лизировали раствором 0.01% Triton X-100 в PBS. Внутриклеточную концентрацию антигена ВИЧ-1



p24 определяли с помощью набора ИФА ВИЧ-1 p24 антиген (ВекторБест, Россия).

#### *Анти-SARS-CoV-2 активность*

Клетки Vero E6 высевали в 96-луночные планшеты при плотности  $2 \times 10^4$  клеток на лунку. После 18 ч инкубации, монослой клеток инокулировали  $100\text{TCID}_{50}$  SARS-CoV-2 в отсутствие или в присутствии различных концентраций ФЛА2 (10-кратные разведения в диапазоне концентраций от 0,001 мкг/мл до 100 мкг/мл). После 72 ч инкубации, различия в жизнеспособности клеток вызванные вирус-индуцированным СРЕ, анализировали с использованием метода МТТ. Для этого, в каждую лунку добавляли стоковый раствор МТТ (5 мг/мл в PBS) в конечной концентрации 0,5 мг/мл. После 2 ч инкубации, среду из лунок удаляли и добавляли 150 мкл ДМСО. Абсорбцию измеряли при 590 нм с помощью устройства для считывания микропланшетов SPECTROstar Nano (BMG LABTECH). Данные анализировали с помощью GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Калифорния, США), и  $\text{IC}_{50}$  рассчитывали с помощью нелинейного регрессионного анализа.

#### *Исследование клеточного цикла с использованием бромдезоксисуридина (BrdU)*

Для анализа включения BrdU, клетки Vero E6 инкубировали со 100 мкг/мл различных ФЛА2 в течение 72 ч. Затем, в среду для культивирования клеток добавляли BrdU в конечной концентрации 10  $\mu\text{M}$  и инкубировали в течение 2 ч. После включения BrdU, клетки пермеабелизировали с помощью 70% этанола, охлажденного до  $-20^\circ\text{C}$ , в течение 30 мин на льду. Далее, клетки обрабатывали 2N HCl в течение 30 мин, для денатурирования ДНК хромосом, с последующей нейтрализацией 0,1 M  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  (pH 8.5) в течение 30 мин. Затем, клетки окрашивали anti-BrdU-FITC и PI (йодид пропидия; с РНКазой А). Образцы анализировали с использованием проточного цитометра

MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Германия). Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения FlowJo 10.0.8. (Three Star Inc., Орегон, США). Мертвые клетки исключались посредством анализа прямого рассеяния (FSC) по сравнению с боковым рассеиванием (SSC). Дублетные клетки исключались с помощью анализа FSC-H по сравнению с FSC-A.

#### *Анализ влияния ФЛА2 на цикл репликации SARS-CoV-2*

Клетки Vero E6 ( $3 \times 10^4$  клеток/лунку) обрабатывали ФЛА2 (10 мкг/мл) на различных стадиях вирусной инфекции. Для «постоянного» действия, клетки предварительно обрабатывали ФЛА2 в течение 1 ч до заражения вирусом, с последующей инкубацией с вирусом в течение 1 ч в присутствии ФЛА2. Затем, клетки промывали PBS и дополнительно культивировали со средой, содержащей ФЛА2, до конца эксперимента. Для обработки «проникновения», ФЛА2 добавляли к клеткам за 1 ч до заражения вирусом и в течение 1 ч прикрепления вируса. Затем смесь вирус-ФЛА2 заменяли свежей культуральной средой без ФЛА2 до конца эксперимента. Для эксперимента «после проникновения», вирус был добавлен к клеткам, чтобы обеспечить возможность инфицирования в течение 1 ч, а затем вирусосодержащий супернатант был заменен на среду, содержащую ФЛА2, до конца эксперимента. Клетки инфицировали SARS-CoV-2 (множественность инфекции, MOI = 0,01), и через 18 ч супернатанты из клеточной культуры в каждом эксперименте по каждой временной точке собирали для измерения выхода вируса с помощью qOT-ПЦР.

#### *Экстракция вирусной РНК SARS-CoV-2 и определение вирусной нагрузки*

Вирусную РНК выделяли и очищали из супернатанта клеток Vero E6 с использованием ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Для количественного определения вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в режиме «реального времени», использовали набор для ОТ-ПЦР

«SARS-CoV-2 FRT» (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Россия) с помощью прибора QuantStudio 5 (Applied Biosystems). Стандартная кривая была построена путем определения числа копий из серийных разведений ( $10^3$ - $10^8$  копий) плазмиды.

### *Получение псевдо-SARS-CoV-2 и анализ антивирусной активности ФЛА2*

Для получения псевдовиральных частиц SARS-CoV-2, суспензию клеток 293Т высевали на чашку Петри (10 см) и трансфицировали 10 мкг плазмиды pLVPG, 8 мкг pCMV-deltaR8.2 (Addgene, #12263) и 5 мкг pVAX-1-S-гликопротеин (Евроген, Россия) с использованием реагента для трансфекции Transporter™ 5. Плазмиды pCG1-SARS-2-S кодирующие S-гликопротеин линий SARS-CoV-2 B.1.1.7 и B.1.351 были любезно предоставлены Thomas Schultz (German Center for Infection Research). Через 72 ч после трансфекции, супернатант собирали, осветляли центрифугированием и пропускали через фильтр с размером пор 0.45 мкм, разделяли на аликвоты и замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Для оценки нейтрализации псевдо-SARS-CoV-2, ФЛА2 инкубировали с равным объемом псевдовируса при  $37^{\circ}\text{C}$ . Затем, смесь переносили на монослой клеток 293Т/ACE2 в 96-луночный планшет. После инкубации в течение 72 ч, GFP-положительные клетки подсчитывали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Olympus (Япония).

### *Вирулицидная активность ФЛА2 против SARS-CoV-2*

Сток SARS-CoV-2 ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>) инкубировали с последовательными десятичными разведениями ФЛА2 (0,1-10 мкг/мл) в течение 1 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ . Затем, образцы вируса, обработанные ФЛА2, разбавляли ниже IC<sub>50</sub> и титровали на клетках Vero E6 методом предельных разведений в 96-луночных планшетах. Исходный вирус и вирус обработанный PBS, использовали в качестве контроля. Планшеты инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  (5% CO<sub>2</sub>) в течение 72

ч. СРЕ оценивали визуально под микроскопом, а титры вирусов рассчитывали по методу Reed and Muench [205].

#### *Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ)*

Бычий коронавирус (BCV) или SARS-CoV-2 обрабатывали 10 мкг/мл ФЛА в течение 1 ч при 37°C. Пятьдесят микролитров образца помещали на предметные стекла и медную сетку TEM 200 меш. Затем, сетку удаляли, промокали фильтровальной бумагой и подвергали воздействию 1% раствора уранилацетата. Избыток уранилацетата удаляли, сетки сушили на воздухе и исследовали под электронным микроскопом JEM-2100 Plus (JEOL Ltd, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

#### *Анализ S-гликопротеин опосредованного слияния клеток*

Эффекторные клетки 293Т трансфицировали плазмидой pUCHR-IRES-GFP (любезно предоставлена Мазуровым Д.В., Институт биологии гена), кодирующей GFP, и плазмидой pVAX-1-S-гликопротеин, кодирующей полноразмерный гликопротеин SARS-CoV-2 Spike (293Т-GFP-Spike). В качестве клеток-мишеней использовали клетки Vero E6 ( $3 \times 10^4$  клеток на лунку), экспрессирующие рецепторы ACE2 на поверхности мембраны, которые предварительно засеивали в 96-луночных планшеты и инкубировали в течение 18 ч. Далее добавляли  $10^4$  эффекторных клетки (293Т-GFP-Spike) на лунку в присутствии или в отсутствии ФЛА2 в различных концентрациях и инкубировали при 37°C в течение 2 ч. Процент слияния клеток рассчитывали путем подсчета слитых клеток в каждой лунке в пяти случайных полях с использованием эпифлуоресцентного микроскопа Olympus (Япония).

#### *Анализ связывания anti-ACE2 и RBD SARS-CoV-2*

Клетки 293Т/ACE2 инкубировали при 37°C в PBS (содержащем 0.5% бычьего сывороточного альбумина) в присутствии ФЛА2 (100 мкг/мл) в течение 20 мин. Затем, клетки помещали на лед и окрашивали anti-ACE2-PE в

течение 1 ч. Для анализа связывания RBD, клетки 293Т/ACE2 инкубировали с рекомбинантным белком RBD, слитым с Fc (любезно предоставленным Калининым Р.С., ИБХ РАН), с последующим окрашиванием DyLight 650 - конъюгированным козьим антителом против Fc человека. Клетки анализировали с помощью проточного цитометра MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Германия).

*Исследование синергидных эффектов ФЛА2 с анти-ВИЧ препаратами*

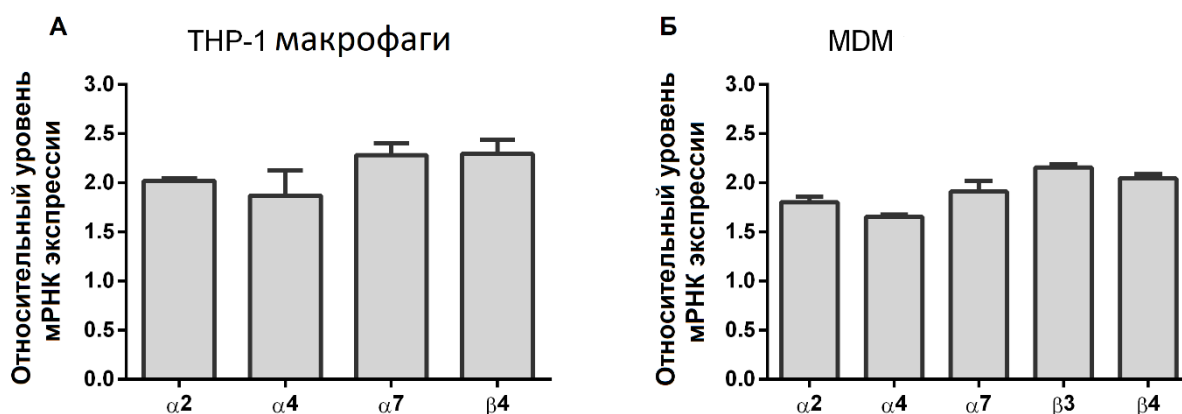
Ингибирующая активность ФЛА2 НДР-2 в комбинациях с ламивудином (ЗТС) или тенофовира дизопроксил фумаратом (ТДФ) против ВИЧ-1 была проанализирована с использованием эталонной модели нулевого взаимодействия (ZIP) SynergyFinder 2 [206]. Клетки МТ-4 обрабатывали разными концентрациями НДР-2 и соответствующего лекарственного препарата и инфицировали ВИЧ-1 ПШВ (100TCID<sub>50</sub>). Через 72 ч вирус-индуцированный СРЕ определяли с использованием метода МТТ. Процент ингибирования ВИЧ-1 в результате комбинаций НДР-2/ЗТС или НДР-2/ТДФ оценивали на синергидное действие на основе баллов синергизма с помощью концентрационно-матричного метода.

### 3 Результаты

#### 3.1 Исследование функциональной активности и биологической роли нАХР в макрофагах человека в норме и при воспалении *in vitro*

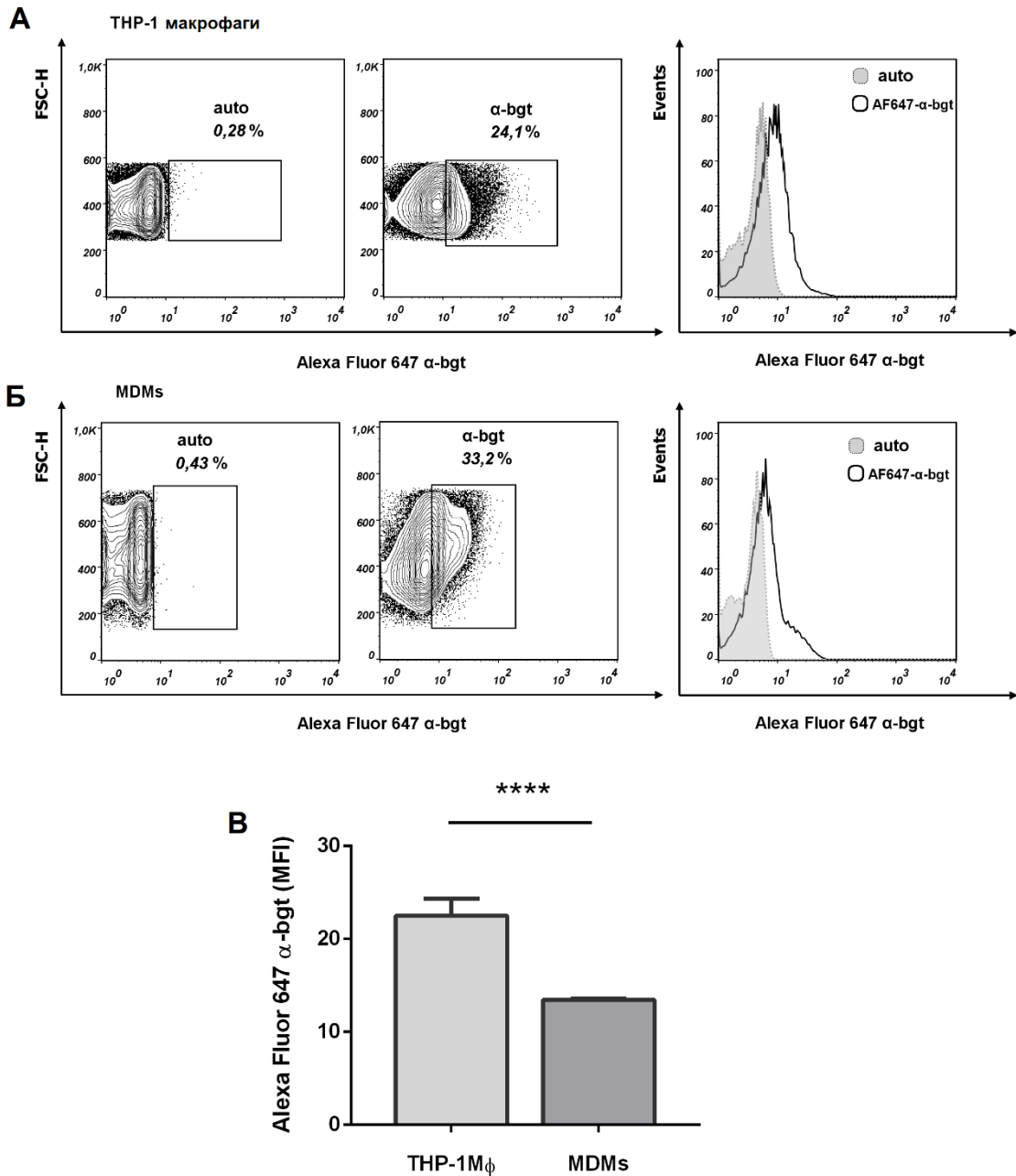
##### 3.1.1 Оценка экспрессии субъединиц нАХР и функциональной активности $\alpha 7$ нАХР в макрофагах человека

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. 9). Используя ген-специфические праймеры, определяли относительный уровень мРНК экспрессии транскриптов для отдельных субъединиц нАХР. Транскрипт  $\alpha 1$  субъединицы нАХР мышечного типа достоверно не был обнаружен в ТНР-1ф и MDM. Кроме того, 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 9.** Относительный уровень экспрессии мРНК субъединиц транскриптов нАХР А) в макрофагах, полученных из моноцитарных клеток человека (ТНР-1Мф) и В) макрофагах, происходящих из моноцитов (MDM), исследована с помощью qOT-ПЦР. Данные представлены как относительная экспрессия  $\pm$  SEM, нормализованная к экспрессии эндогенного  $\beta$ -актина.

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  $\alpha 7$  nAХР (AF647- $\alpha$ -bgt). Согласно результатам проточной цитометрии, связывание AF647- $\alpha$ -bgt было четко обнаружено как на ТНР-1Мф (Рис. 10А), так и на MDM (Рис. 10Б). Более высокая флуоресценция на клетку (MFI) наблюдалась на ТНР-1Мф (связывание AF647- $\alpha$ -bgt с рецепторами на ТНР-1Мф по сравнению с MDM:  $22,5 \pm 1,8$  vs  $13,4 \pm 0,1$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; Рис. 10В). Таким образом, ТНР-1Мф и MDM экспрессировали  $\alpha 7$  nAХР на поверхности клеток, где более высокая экспрессия наблюдалась на ТНР-1Мф.

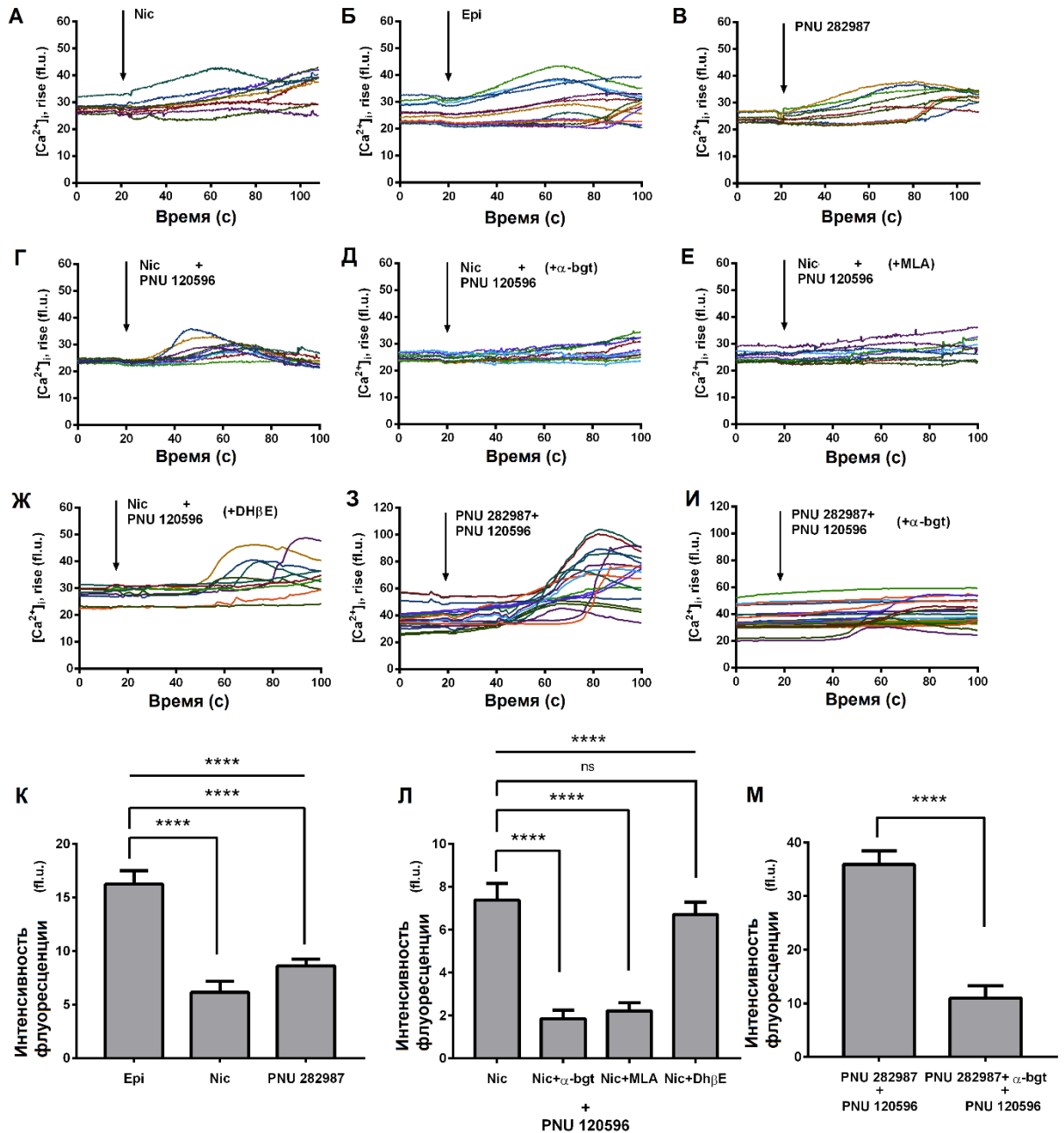


**Рисунок 10.** Экспрессия  $\alpha 7$  рецепторов на поверхности клеток THP-1Mφ и MDMs. Моноциты THP-1 или первичные моноциты человека дифференцировали в макрофаги (THP-1Mφ и MDM соответственно) и окрашивали  $\alpha$ -бунгаротоксином, меченным с Alexa Fluor 647 (AF647- $\alpha$ -bgt). Окрашивание клеток анализировали методом проточной цитометрии. А) Показана экспрессия  $\alpha 7$ -рецептора на клетках THP-1Mφ или Б) MDMs. Гистограммы с серыми точками - автофлуоресценция клеток; гистограммы с черными линиями - клетки, окрашенные AF647- $\alpha$ -bgt. В) Интенсивность флуоресценции при связывании AF647- $\alpha$ -bgt на THP-1Mφ и MDM. Данные получены из трех независимых экспериментов, проведенных с MDM от разных доноров. t-критерий Стьюдента: \*\*\*  $p < 0,001$ .

В последующих экспериментах более детально была проанализирована функциональная экспрессия nAChR на макрофагах, полученных после



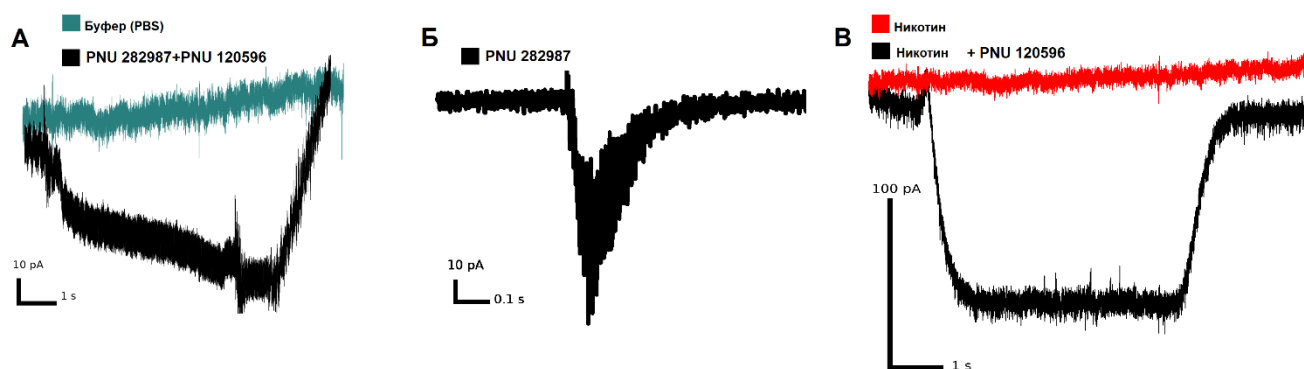
дифференцировки клеток ТНР-1. Для этого был использован метод кальциевого ( $\text{Ca}^{2+}$ ) имиджинга. Применение неселективного агониста нАХР никотина ( $\text{Nic}$ ,  $100 \mu\text{M}$ ) привело к повышению концентрации кальция в некоторых клетках (Рис. 11А, К). Этот эффект стал более заметным после применения более сильного агониста эпibatидина ( $\text{Epi}$ ,  $10 \mu\text{M}$ , Рис. 11Б, К) и селективного агониста  $\alpha 7$ -рецепторов PNU 282987 ( $1 \mu\text{M}$ , Рис. 11В, К). Из литературных данных известно, что очень сложно или даже невозможно обнаружить опосредованный  $\alpha 7$ -рецепторами кальциевый ответ в нейронах и клетках нейробластомы в отсутствие селективного положительного аллостерического модулятора  $\alpha 7$  нАХР - PNU 120596, который способствует снижению чрезвычайно высокой скорости десенсibilизации рецепторов. С использованием PNU 120596 ( $10 \mu\text{M}$ ) на клетках ТНР-1ф, мы наблюдали значительное увеличение количества никотин-чувствительных клеток и увеличение амплитуды концентрации кальция (Рис. 11Г, Л). Предварительная инкубация клеток ТНР-1ф с  $10 \mu\text{M}$   $\alpha$ -bgt (Рис. 10Д, Л) и  $1 \mu\text{M}$  метилликаконитином (MLA, Рис. 11Е, Л), но не с  $50 \mu\text{M}$  дигидро- $\beta$ -эритроидином ( $\text{Dh}\beta\text{E}$ , Рис. 11Ж, Л) почти полностью отменила наблюдаемое повышение концентрации кальция. Совместное применение селективного агониста  $\alpha 7$ -рецепторов ( $1 \mu\text{M}$  PNU 282987) и положительного аллостерического модулятора ( $10 \mu\text{M}$  PNU 120596) к клеткам ТНР-1ф, привело к повышению уровня концентрации кальция с максимальной амплитудой ответа (Рис. 11З,М), которое значительно подавлялось применением  $10 \mu\text{M}$   $\alpha$ -bgt.



**Рисунок 11.** Кальциевый имиджинг в клетках THP-1Мф. Макрофаги, полученные из клеток THP-1, загружали кальциевым индикатором Fluo-4 AM и анализировали с использованием эпифлуоресцентного микроскопа. Показаны трейсы изменения  $[Ca^{2+}]_i$  в клетках в течение 100 с. Данные были получены до (0 с) и после (100 с) воздействия на клетки селективного агониста  $\alpha 7$ -рецептора, что соответствует времени, в которое наблюдалось максимальное увеличение  $[Ca^{2+}]_i$ . Максимальный ответ наблюдался не позднее 80 с; А) 100  $\mu$ М никотина (Nic), Б) 10  $\mu$ М эпитатидина (Epi), В) 1  $\mu$ М PNU 282987, Г) 100  $\mu$ М никотина и 10  $\mu$ М PNU 120 596, Д) 1  $\mu$ М PNU 282987 и 10  $\mu$ М PNU 120596 апплицировали на клетки; 100  $\mu$ М никотина и 10  $\mu$ М PNU 120596 апплицировали на клетки после 20 мин предварительной инкубации с Е) 10  $\mu$ М  $\alpha$ -bgt, Ж) 1  $\mu$ М метилликаконитином (MLA) и З) 50  $\mu$ М дигидро- $\beta$ -эритроидином (Dh $\beta$ E); И) 1  $\mu$ М PNU 282987 и 10  $\mu$ М PNU 120596 апплицировали на клетки после 20 мин предварительной инкубации с 10  $\mu$ М  $\alpha$ -bgt. Каждая кривая представляет изменения внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  в одной клетке. Стрелка указывает на время аппликации агониста. К-М) Столбцы представляют собой нормализованные амплитуды клеточного ответа, выраженные как среднее $\pm$ SEM

относительной интенсивности флуоресценции каждой клетки (измеренной при максимальном значении за вычетом базовой флуоресценции). Было проанализировано не менее 30–50 клеток/условие. Fl.u. - флуоресцентные единицы. ANOVA тест с Turkey post hoc тестом: \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

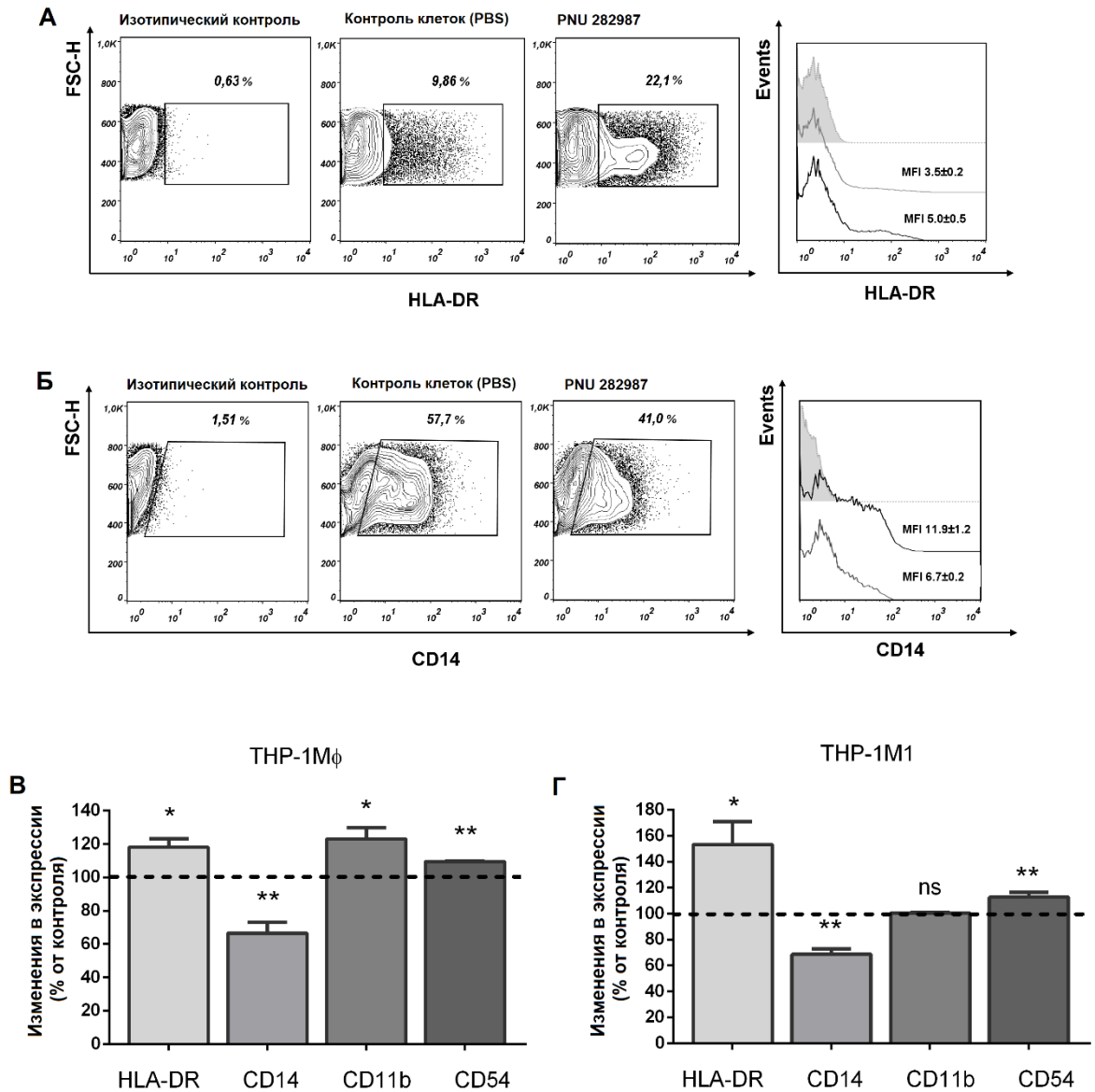
Эксперименты с использованием электрофизиологии и метода локальной фиксации потенциала показали, что  $\alpha 7$ -рецептор, экспрессируемый на ТНР-1Мф, функционирует как ионный канал. На Рис. 12А показана типичная кривая тока, записанная с ТНР-1Мф при одновременном применении 1  $\mu\text{M}$  PNU 282987 и 10  $\mu\text{M}$  PNU 120596. Положительный аллостерический модулятор PNU 120596 упрощает регистрацию тока, поскольку устраняет быструю десенситизацию рецепторов, которая характерна для  $\alpha 7$  nAХР. Пять из двадцати трех протестированных клеток ТНР-1Мф продемонстрировали ионные токи при применении либо PNU 282987 (с или без PNU 120596, Рис. 12А, Б), либо никотина с PNU 120596 (Рис. 12В). Интересно отметить, что не было обнаружено токов при аппликации никотина на клетки (Рис. 12В).



**Рисунок 12.** 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.

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

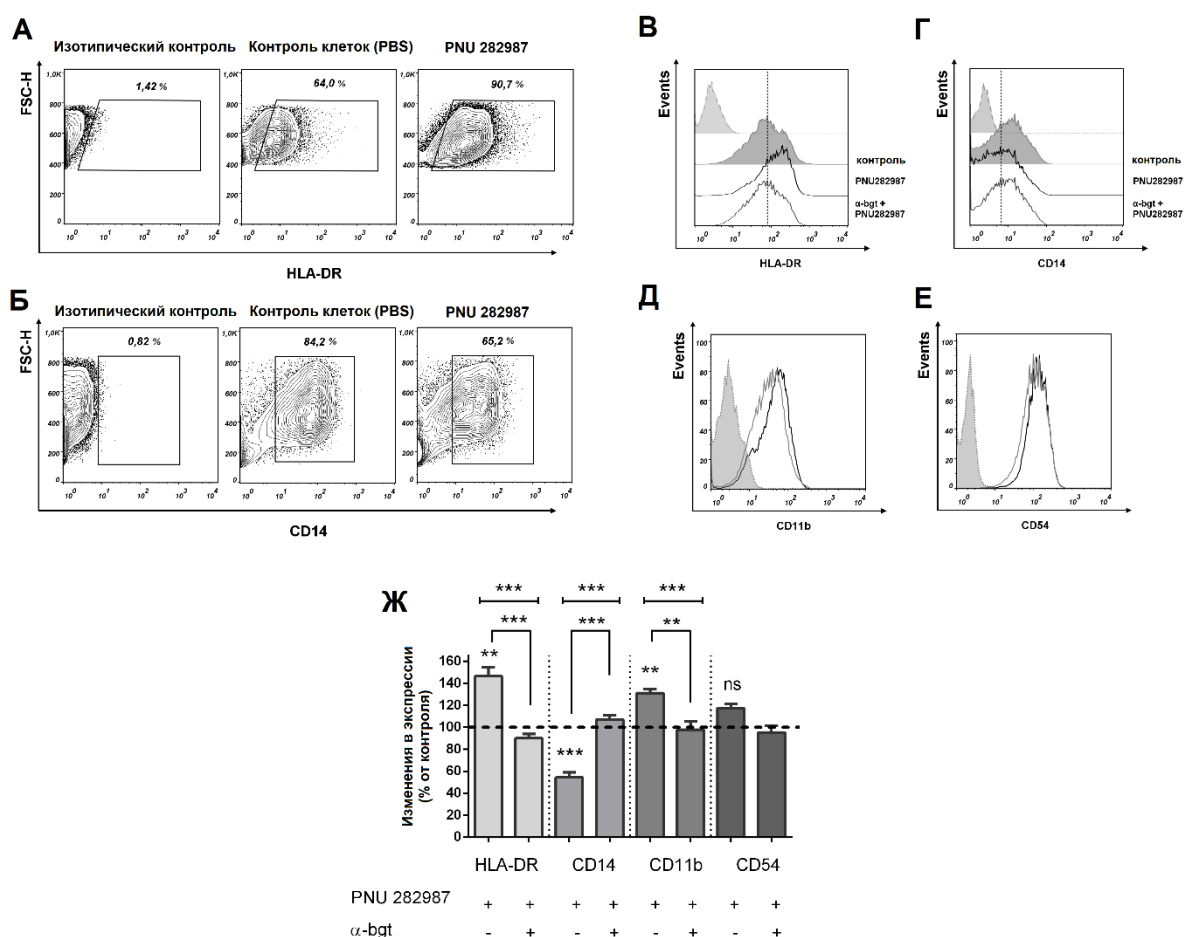
В ходе работы было исследовано, как влияет активация  $\alpha 7$  nAXR на экспрессию таких мембранных молекул и рецепторов, как HLA-DR и CD14, участвующих в воспалении, а также CD11b и CD54, участвующих в межклеточных взаимодействиях. Моноциты THP-1 или первичные моноциты человека были дифференцированы в макрофаги, после чего макрофаги THP-1 поляризовали в классически активированные макрофаги (M1) с помощью IFN- $\gamma$  (20 нг/мл) и LPS *E. coli* (100 нг/мл). Эффект селективного агониста  $\alpha 7$ -рецепторов PNU 282987 на экспрессию макрофагальных мембранных маркеров на клетках THP-1Mф, THP-1M1 или MDM изучали спустя 48 ч активации (Рис. 13).



**Рисунок 13.** 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. Клетки обрабатывали PNU 282987 в течение 48 час и анализировали проточной цитометрией. PNU 282987 приводил к А) увеличению доли флуоресценции и количества HLA-DR-положительных клеток с Б) уменьшению экспрессии CD14. Гистограммы: серые пунктирные - изотипический контроль; черная линия - контрольные клетки; серая линия – клетки, обработанные PNU 282987. Цифры на гистограммах представляют собой MFI ± SEM (среднее геометрическое для всей популяции клеток). Изменения наблюдались в уровне экспрессии мембранных белков HLA-DR, CD14, CD11b и CD54 на В) THP-1Mφ и на Г) THP-1M1. Стимуляция клеток с помощью PNU 282987 также приводила к повышенной экспрессии молекул адгезии CD54 и рецептора комплемента CD11b. Данные были получены в трех независимых экспериментах и представлены как среднее±SEM. t-критерий Стьюдента: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  и ns  $p > 0,05$  по сравнению с необработанными контрольными клетками.

Обработка клеток PNU 282987 индуцировала 20% повышение экспрессии HLA-DR во время созревания ТНР-1Мф (Рис. 13В). Данный агонист индуцировал заметное (~50%) увеличение экспрессии молекул HLA-DR в классически активированных макрофагах ТНР-1М1 (Рис. 13А, Г). Действие PNU 282987 на клетки ТНР-1Мф и ТНР-1М1 приводило к ингибированию экспрессии рецептора CD14 (Рис. 13Б-Г), что отражалось в уменьшении количества CD14 положительных клеток и более низкой интенсивности флуоресценции по сравнению с необработанными контрольными клетками. Более того, PNU 282987 увеличивал экспрессию молекул адгезии макрофагов CD54 и рецептора комплемента CD11b (Рис. 13В, Г), где наиболее высокий уровень экспрессии наблюдался в ТНР-1Мф во время созревания. Изменений в экспрессии CD11b в ТНР-1М1 в присутствии PNU 282987 не наблюдалось.

Влияние PNU 282987 на экспрессию перечисленных выше мембранных белков также оценивали с использованием MDM: наблюдалось увеличение HLA-DR (Рис. 14А) и снижение экспрессии CD14 (Рис. 14Б).



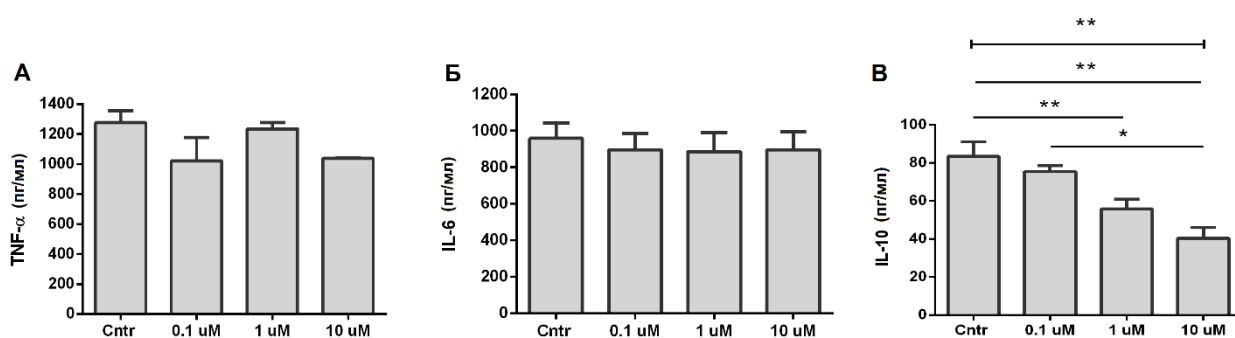
**Рисунок 14.** Репрезентативный профиль экспрессии и анализ влияния PNU 282987 на экспрессию HLA-DR, CD14, CD54 и CD11b в MDM. Показаны уровни экспрессии А) HLA-DR и Б) CD14 в PNU 282987 обработанных и необработанных (контроль) MDM. Клетки обрабатывали PNU 282987 или PNU 282987 +  $\alpha$ -bgt в течение 48 ч и анализировали с помощью проточной цитометрии. PNU 282987 индуцировал увеличение экспрессии В) молекул HLA-DR, Д) CD11b, Е) CD54 и снижал экспрессию Г) CD14; действие PNU 282987 блокируется антагонистом  $\alpha$ 7-рецепторов -  $\alpha$ -bgt. Гистограммы: серые пунктирные - изотипический контроль; серая линия - контрольные клетки; черная линия - клетки, обработанные PNU 282987. Ж) Изменения уровня экспрессии мембранных белков, участвующих в воспалении на MDM, обработанных PNU 282987. Столбцы отображены как среднее  $\pm$  SEM. Результаты получены в трех экспериментах с MDM от трех разных доноров. ANOVA тест с Tukey post hoc тестом: PNU 282987 vs контрольные клетки и PNU 282987 vs PNU 282987 +  $\alpha$ -bgt: \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , ns  $p > 0,05$ .

Обработка клеток с помощью PNU 282987 также вызывала увеличение доли интенсивной флуоресценции CD11b и CD54 в регионе положительных клеток (Рис. 14Д, Е). Процент экспрессии этих молекул был аналогичен уровню экспрессии CD54 и CD11b на PNU 282987 обработанных THP-1Мф. Чтобы подтвердить, что повышение экспрессии HLA-DR и снижение экспрессии CD14 является результатом активации  $\alpha$ 7 нАХР, MDM

предварительно инкубировали с антагонистом  $\alpha 7$ -рецепторов -  $\alpha$ -bgt (10  $\mu$ M), что приводило к отмене эффектов, индуцированных PNU 282987, таких как увеличение экспрессии HLA-DR (Рис. 14В, Ж), ингибирование экспрессии CD14 (Рис. 14Г, Д), а также увеличение экспрессии CD11b (Рис. 14Ж).

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

Продукция цитокинов при активации  $\alpha 7$  nAHP с помощью PNU 282987 была изучена в LPS-стимулированных макрофагах THP-1. Клетки предварительно обрабатывали PNU 282987 (0,1–10  $\mu$ M) в течение 30 мин, а затем стимулировали LPS (500 нг/мл) в течение 24 ч. Стимуляция клеток с помощью LPS в присутствии PNU 282987 не приводила к существенным изменениям продукции TNF- $\alpha$  (Рис. 15А). Активация  $\alpha 7$  nAHP с помощью PNU 282987 не влияла на высвобождение IL-6 при любой из протестированных концентраций (Рис. 15Б). Однако было обнаружено дозозависимое ингибирование LPS-индуцированного высвобождения IL-10 в макрофагах, обработанных PNU 282 987 (Рис. 15В).



**Рисунок 15.** Уровни содержания цитокинов в культуральной среде. Макрофаги THP-1Мф обрабатывали различными дозами PNU 282987 в течение 30 мин, после чего производили стимуляцию липополисахаридом (LPS). Уровни А) фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Б) интерлейкина (IL) -6 и В) IL-10 определяли спустя 24 ч с помощью ИФА. Столбцы отображены как среднее  $\pm$  SEM. Данные были получены в трех независимых экспериментах. ANOVA тест с Turkey post hoc тестом: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

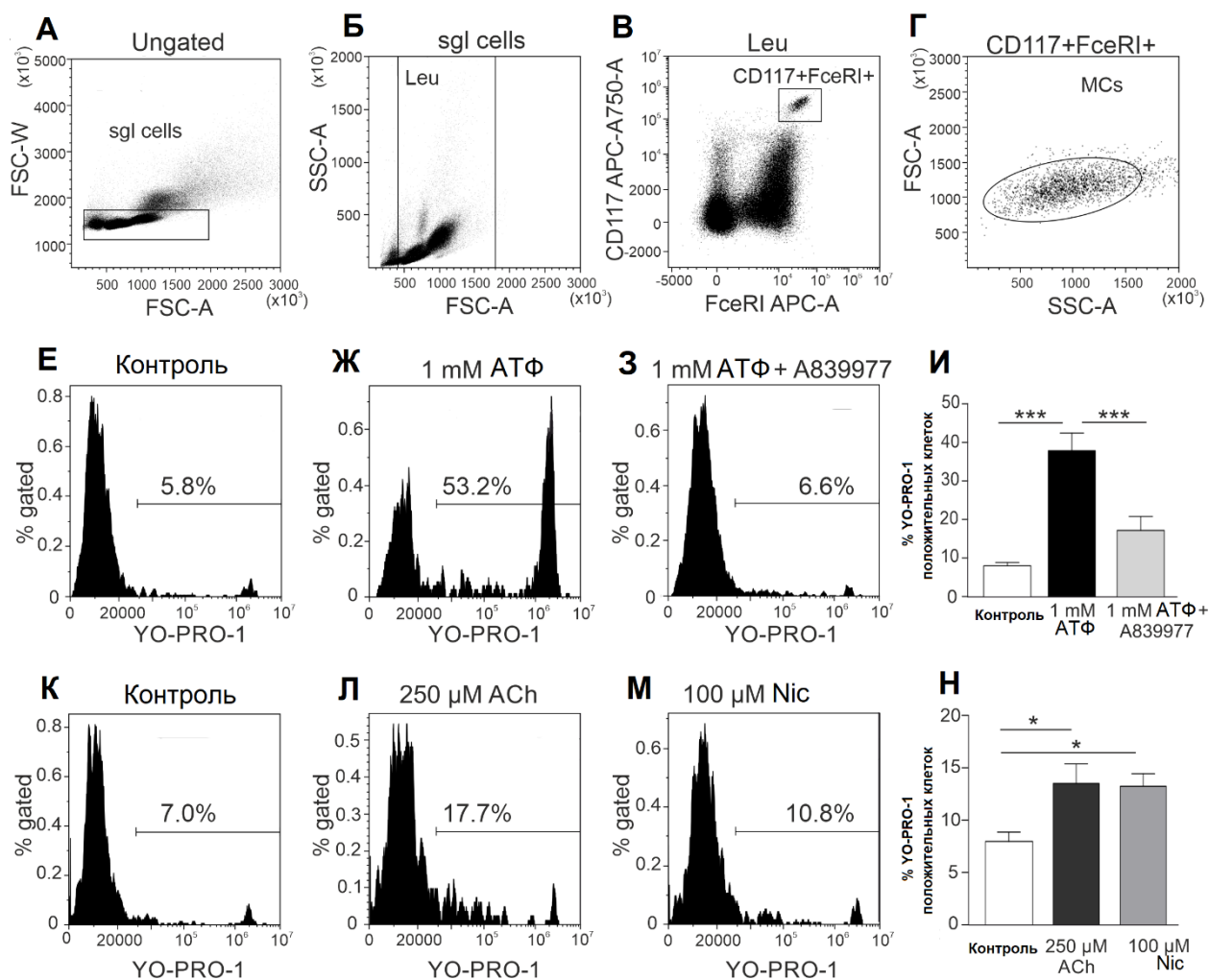


## **3.2 Изучение влияния холинергических лигандов $\alpha 7$ nAHP на функциональную активность P2X7 рецепторов**

### ***3.2.1 Исследование действия холинергических агонистов на АТФ-индуцированное поглощение YO-PRO-1 тучными клетками***

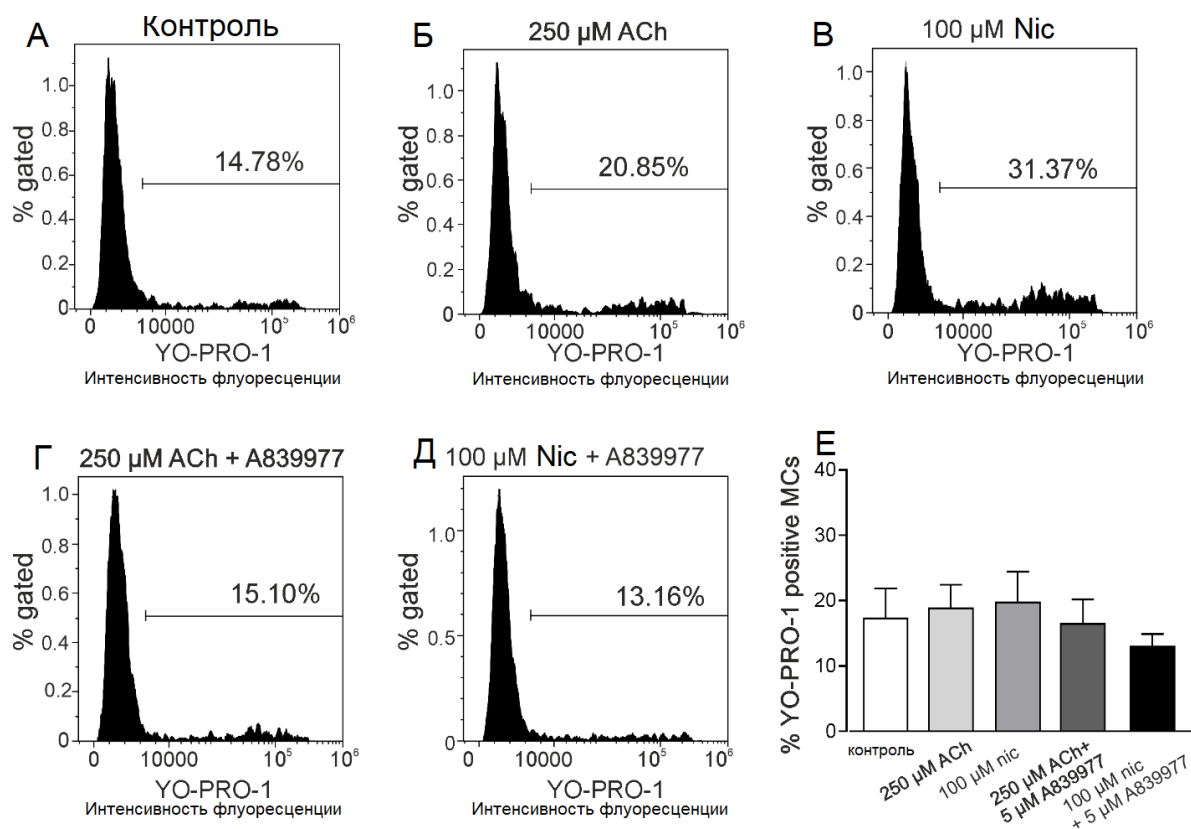
Недавние исследования показали, что стимуляция различных типов иммунных клеток с помощью холинергических агонистов, приводит к полному блокированию АТФ-индуцированной активации P2X7 рецепторов и высвобождения IL-1 $\beta$ . В ходе работы мы решили изучить перекрестное влияние агонистов nAHP на функциональную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

Тучные клетки идентифицировали как популяцию позитивную как по Fc $\epsilon$ RI, так и по CD117 (Рис. 16А-Г) и анализировали в них активацию рецептора P2X7 (Рис. 16Е-И).



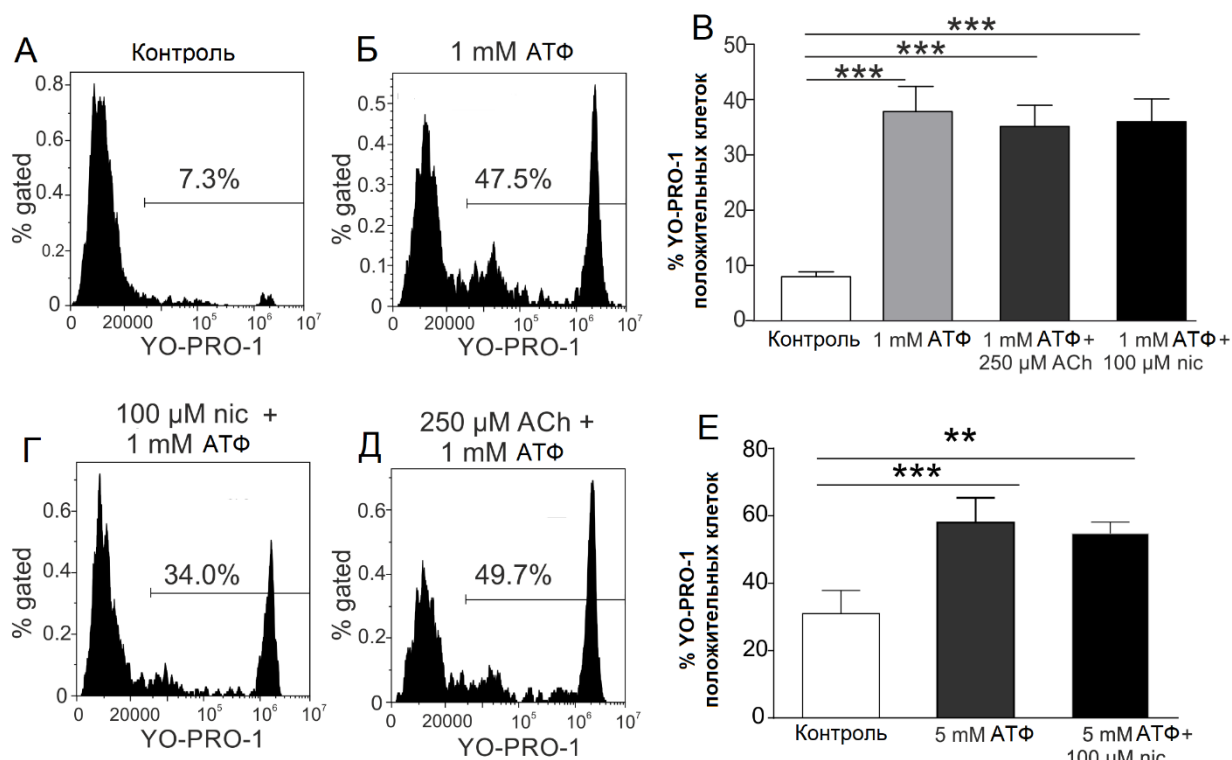
**Рисунок 16.** Стратегия гейтирования с использованием проточной цитометрии для идентификации тучных клеток и тестирования действия АТФ, ацетилхолина и никотина на поглощение YO-PRO-1 тучными клетками. А) Гейтирование на основе FSC-A по сравнению с FSC-W. Б) График светорассеяния для клеток на основе прямого (FSC-A) и бокового рассеяния (SSC-A). В) Субпопуляции клеток при окрашивании Alexa Fluor 647-FcεRI и APC-Cy7-CD117. Г) Популяция двойных положительных тучных клеток. Клетки из области «тучных клеток» далее использовали для оценки эффектов АТФ, ацетилхолина и никотина. Е-И, К-Н) Репрезентативные гистограммы поглощения YO-PRO-1 тучными клетками. Е, К) Отрицательный контроль [обработанные фосфатно-солевым буфером (PBS)], тучные клетки мыши, инкубированные с 1 μM YO-PRO-1. Ж) Тучные клетки инкубировали с 1 mM АТФ в течение 20 мин. З) Тучные клетки, предварительно инкубированные с антагонистом P2X7 А839977 (5 μM), с последующей стимуляцией 1 mM АТФ. И) Гистограммы, показывающие процент YO-PRO-1-положительных клеток в контроле (белый, n = 12), после стимуляции 1 mM АТФ (черный, n = 12) и в присутствии антагониста P2X7 А839977 (5 μM; серый, n = 9). Л) Тучные клетки, инкубированные с 250 μM ацетилхолина. М) Тучные клетки, инкубированные с 100 μM никотина. Н) Гистограммы, показывающие процент YO-PRO-1-положительных клеток в контроле (белые, n = 12) после стимуляции 250 μM ацетилхолина (черный, n = 5) и 100 μM никотина (серый, n = 5). Данные представлены как среднее ± SEM, \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,0001$  (ANOVA тест с последующим сравнительным тестом Bonferroni).

Краситель YO-PRO-1 был использован для обнаружения открытия каналов рецептора P2X7, в частности, больших пор, связанных с активацией инфламмасом. Использовались относительно высокие концентрации АТФ, поскольку рецепторы P2X7 имеют низкое сродство к этому пуринергическому агонисту. Наши данные показывают, что стимуляция свежесыведенных тучных клеток 1 mM АТФ вызвала значительное увеличение процента YO-PRO-1-положительных клеток ( $8,0 \pm 0,9\%$  в контроле, до  $37,8 \pm 4,6\%$  после стимуляции АТФ,  $n = 12$ ,  $p < 0,001$ ; Рис. 16Е, Ж, И). Это увеличение полностью ингибировалось специфическим антагонистом рецептора P2X7 A839977 (5  $\mu\text{M}$ ,  $n = 9$ ,  $p < 0,001$ ; Рис. 16З, И), подтверждая, что поглощение YO-PRO-1 опосредовано через ионные каналы P2X7. Интересно отметить, что инкубация с 250  $\mu\text{M}$  ацетилхолина вызвала небольшое, но значительное увеличение процента YO-PRO-1-положительных тучных клеток ( $13,5 \pm 1,9\%$ ,  $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ; Рис. 16К, Л, Н). Аналогичный эффект наблюдался также при использовании 100  $\mu\text{M}$  никотина, что приводило к увеличению процента YO-PRO-1-положительных клеток до  $13,2 \pm 1,2\%$  ( $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ; Рис. 16М, Н). Чтобы оценить, связан ли этот небольшой эффект с открытием большой поры рецептора P2X7, мы повторили этот тест, после предварительной инкубации тучных клеток с антагонистом P2X7 A839977. Мы обнаружили, что в присутствии A839977 процент YO-PRO-1-положительных клеток после применения ацетилхолина и никотина немного снижался (Рис. 17), однако этот эффект не был статистически достоверным ( $p > 0,05$  для обоих холинергических лигандов).



**Рисунок 17.** Поглощение YO-PRO-1 тучными клетками, под действием холинергических агентов в присутствии специфического антагониста P2X7 A839977. (А-Д) Репрезентативные гистограммы поглощения YO-PRO-1 тучными клетками. А) Контрольные тучные клетки мыши, инкубированные с 1 μM YO-PRO-1. Б) Тучные клетки, инкубированные с 250 μM ACh. В) Тучные клетки, инкубированные со 100 μM никотина Г) Тучные клетки, предварительно инкубированные с 5 μM A839977, с последующей стимуляцией 250 μM ACh. Д) Тучные клетки предварительно инкубировали с 5 μM A839977 с последующей стимуляцией 100 μM никотина. Е) Гистограммы, показывающие процент YO-PRO-1-положительных клеток в контроле (белый, n = 5) после инкубации с 250 μM ACh (светло-серый, n = 5), 100 μM никотина (серый, n = 5), 250 μM ацетилхолина в присутствии 5 μM A839977 (темно-серый, n = 5,  $p > 0,05$  по сравнению с ацетилхолином) или 100 μM никотина в присутствии 5 μM A839977 (черный, n = 4,  $p > 0,05$  по сравнению с никотином). Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM (ANOVA тест с последующим сравнительным тестом Bonferroni).

Поскольку АТФ способствует надежному открытию ионного канала P2X7 для проникновения YO-PRO-1 в клетку, мы проверили ключевой вопрос: ингибирует ли инкубация этих иммунных клеток с холинергическим агентом открытие ионного канала P2X7 рецептора. Однако ацетилхолин (250 μM) и никотин (100 μM) не снижали активацию тучных клеток, запускаемую АТФ (Рис. 18 В-Е), по сравнению со стимуляцией только АТФ ( $p > 0,05$ ; Рис. 18 А-В).

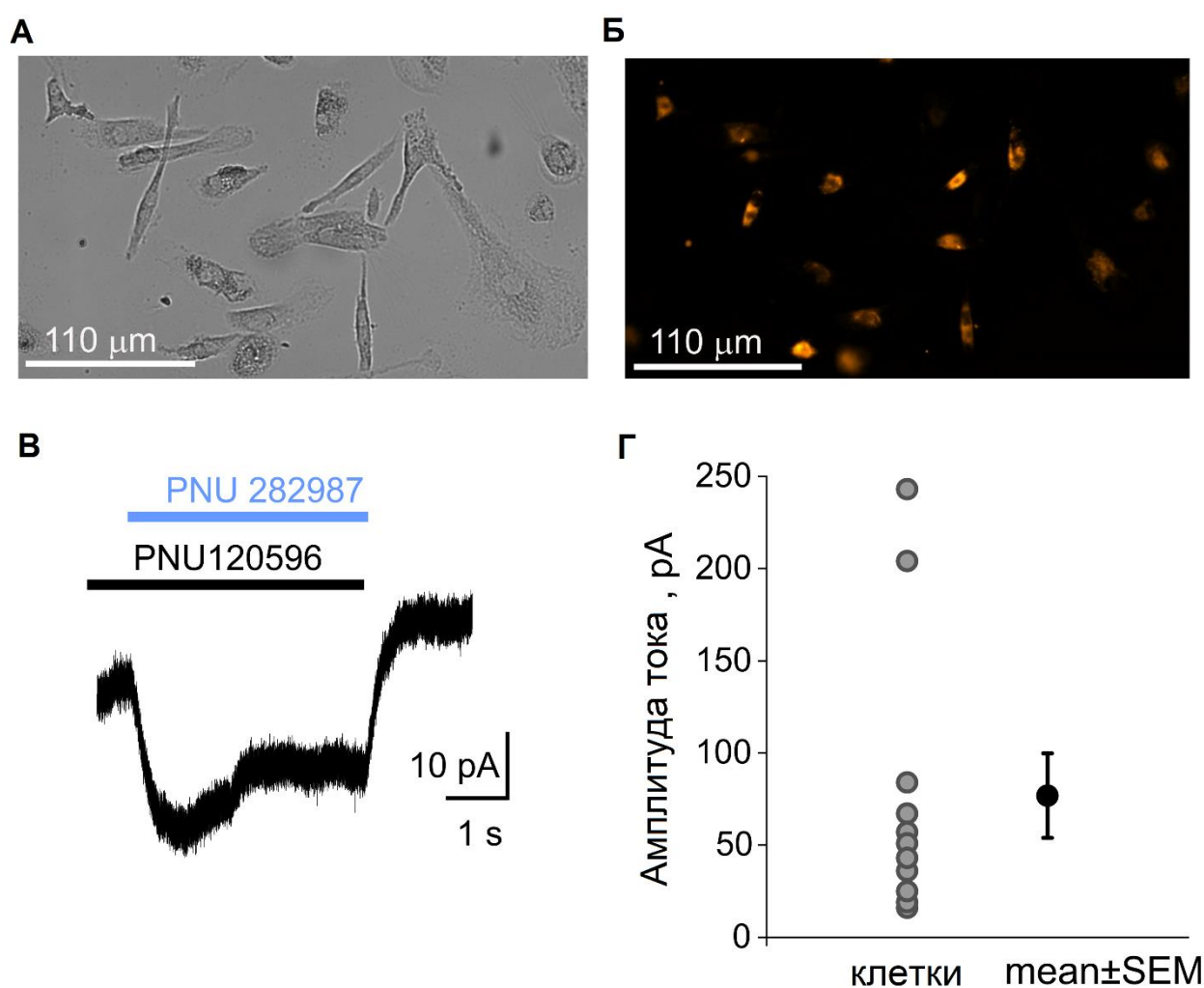


**Рисунок 18.** Репрезентативные гистограммы поглощения YO-PRO-1 тучными клетками. А) Отрицательный контроль (клетки, обработанные PBS), тучные клетки брюшины мыши, инкубированные с 1  $\mu$ M YO-PRO-1. Б) Тучные клетки, инкубированные с 1 mM АТФ. Г) Тучные клетки, предварительно инкубированные со 100  $\mu$ 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) Гистограммы, показывающие процент YO-PRO-1-положительных клеток в контроле (белый,  $n = 12$ ), после стимуляции только 1 mM АТФ (светло-серый,  $n = 12$ ) и в присутствии 250  $\mu$ M ацетилхолина (темно-серый,  $n = 12$ ) или 100  $\mu$ M никотина (черный,  $n = 12$ ). Е) Гистограммы, показывающие процент YO-PRO-1-положительных клеток в контроле (белый,  $n = 3$ ), после стимуляции только 5 mM АТФ (серый,  $n = 3$ ) и в присутствии 100  $\mu$ M никотина (черный,  $n = 12$ ). Данные отображены как среднее  $\pm$  SEM, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  по сравнению с контролем (ANOVA тест с последующим сравнительным тестом Bonferroni).

### 3.2.2 Влияние агонистов nAХР на функциональную активность P2X7 рецепторов в макрофагах человека

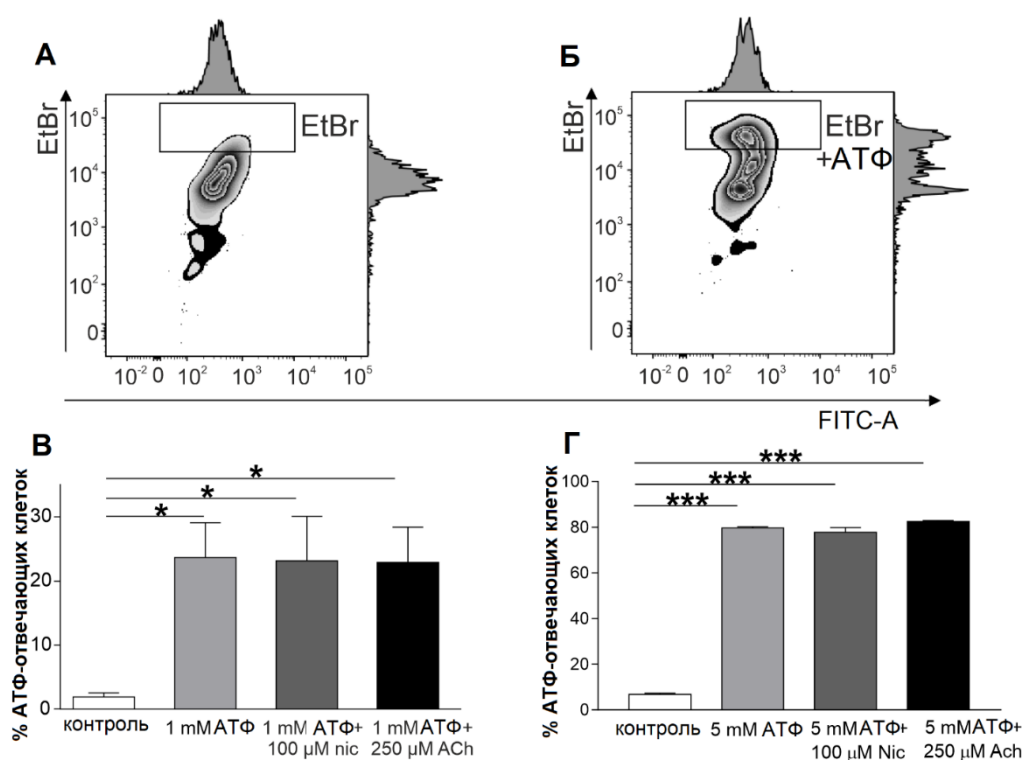
Первоначально было проведено исследование экспрессии  $\alpha 7$  nAХР в первичных макрофагах человека (MDM). Окрашивание MDM с помощью флуоресцентно меченного антагониста  $\alpha$ -бунгаротоксина ( $\alpha$ -bgt) показало, что все клетки являются положительными по связыванию  $\alpha$ -bgt (Рис. 19А, Б). Аналогичным образом, анализ с использованием метода локальной фиксации потенциала продемонстрировал функциональную экспрессию  $\alpha 7$ -рецепторов

на плазматической мембране MDM. На Рис. 19В показан график, полученный при совместном применении PNU 282987 (1  $\mu\text{M}$ ), селективного агониста  $\alpha 7$ -рецепторов, с PNU 120596 (10  $\mu\text{M}$ ), селективным аллостерическим модулятором этого же типа рецепторов. Одиннадцать протестированных клеток показали ионные токи ( $77 \pm 23$  пА,  $n = 11$ ) при применении PNU 282987 совместно с PNU 120596 (Рис. 19Г), что свидетельствует о функциональной экспрессии  $\alpha 7$ -рецепторов.



**Рисунок 19.** Иммуноцитохимическое окрашивание  $\alpha 7$ -рецепторов и метод локальной фиксации потенциала с использованием первичных макрофагов (MDM). А) Световое изображение макрофагов, полученных из моноцитов (MDM). Б) Детекция  $\alpha 7$ -рецепторов с помощью флуоресцентно меченного  $\alpha$ -бунгаротоксина. В) Типичный пример мембранного тока, активированного 1  $\mu\text{M}$  PNU 282987 совместно с 10  $\mu\text{M}$  PNU 120596 на MDM. Черные и синие прямоугольники, отображают аппликацию PNU120596 и PNU282987 соответственно. Г) График, показывающий амплитуды ответов в отдельных MDM ( $77 \pm 23$  пА,  $n = 11$ ).

Для проверки того, может ли холинергическая стимуляция уменьшить открытие больших пор P2X7 после стимуляции АТФ в MDM, мы использовали анализ поглощения этидия бромид (EtBr). Мы обнаружили, что 10-ти минутная инкубация с АТФ индуцировала значительное поглощение этого красителя в MDM (Рис. 20). В присутствии 1 mM АТФ, доля отвечающих клеток увеличивалась с  $1,9 \pm 0,6\%$  до  $23,6 \pm 5,4\%$  ( $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ). После инкубации с 5 mM АТФ, доля окрашенных этидием клеток составила  $87,3 \pm 0,5\%$  по сравнению с  $7,0 \pm 0,8\%$  в контроле ( $n = 3$ ). Тем не менее, как и в случае с тучными клетками, ни ацетилхолин (250  $\mu$ M), ни никотин (100  $\mu$ M) не снижали АТФ индуцированное поглощение этидия (Рис. 20В, Г).



**Рисунок 20.** АТФ-индуцированное поглощение этидия бромид (EtBr) макрофагами, полученных из моноцитов (MDM). А) Репрезентативная гистограмма поглощения EtBr в контроле. Б) Репрезентативная гистограмма поглощения EtBr в присутствии 1 mM АТФ при 37°C в течение 10 мин. В) Гистограммы, показывающие процент EtBr-положительных клеток в контроле (белый,  $n = 5$ ), в присутствии только 1 mM АТФ (светло-серый,  $n = 5$ ) и после преинкубации со 100  $\mu$ M никотина (темно-серый,  $n = 5$ ) или 250  $\mu$ M ацетилхолина (черный,  $n = 5$ ). Г) Гистограммы, показывающие процент EtBr-положительных клеток в контроле (белый,  $n = 5$ ), в присутствии только АТФ 5 mM (светло-серый,  $n = 3$ ) и после предварительной инкубации со 100  $\mu$ M никотина (темно-серый,  $n = 3$ ) или 250  $\mu$ M ацетилхолина (черный,  $n = 3$ ). Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,0001$  (ANOVA тест с Tukey post hoc тестом).

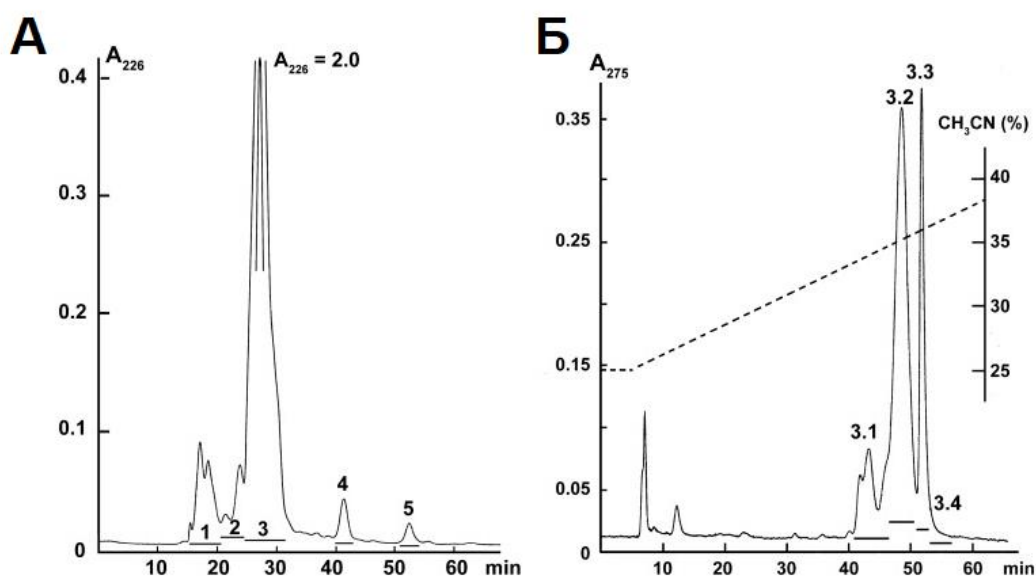


### 3.3 Исследование цитотоксического действия ФЛА2 из яда крайта *Bungarus fasciatus* в отношении раковых клеток

Известно, что секреторные ФЛА2 обладают широким спектром биологических эффектов, которые могут различаться в зависимости от строения и источника выделения ФЛА2. В ходе работы была проанализирована цитотоксическая активность ФЛА2 полученной из яда *Bungarus fasciatus*.

#### 3.3.1 Разделение яда и оценка цитотоксичности ФЛА2

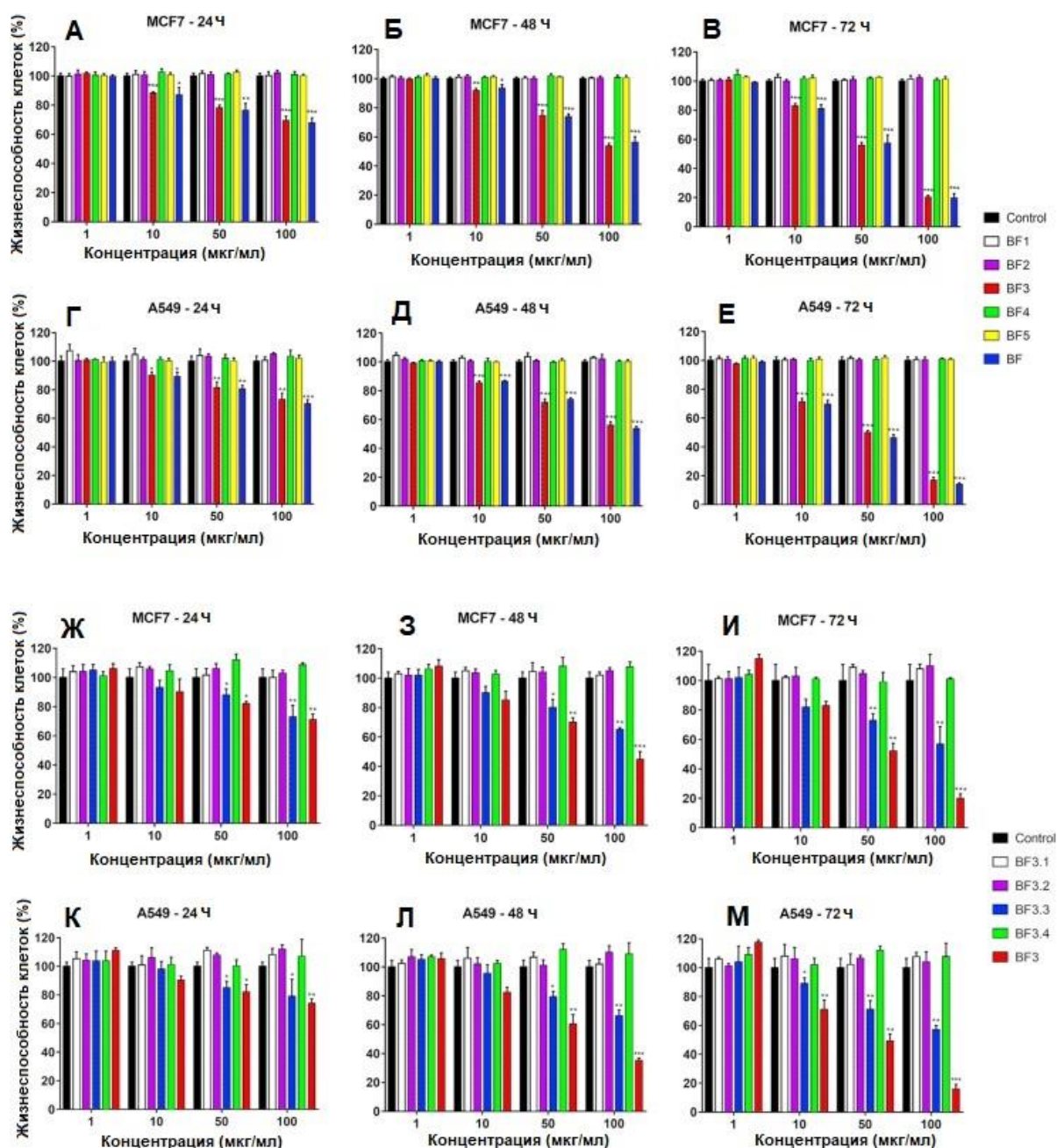
Для выделения активного соединения, обладающего цитотоксическим действием, яд подвергали фракционированию с помощью жидкостной хроматографии. Гель-фильтрация на колонке Superdex 75 использовалась в качестве первой стадии. В результате было получено пять фракций (Рис. 21А).



**Рисунок 21.** Фракционирование яда крайта *B. fasciatus*. А) Гель-фильтрация сырого яда на колонке Superdex® 75 10/300 GL (1 × 30 см), уравновешенной 0,1 М раствором ацетата аммония (рН 6.2). Скорость потока 0,5 мл/мин. Элюат контролировали спектрофотометрически (OD = 226 нм). Горизонтальные полосы указывают на собранные фракции. Б) Обращенно-фазовая хроматография фракции 3 (из А) на колонке Jupiter C18 (10 × 250 мм) в градиенте 25-40% ацетонитрила в течение 75 минут в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты при скорости потока 2,0 мл/мин. Элюат контролировали спектрофотометрией (OD = 275 нм). Горизонтальные полосы указывают на собранные фракции. Работа выполнена совместно с сотрудниками лаборатории проф. Уткина Ю.Н.



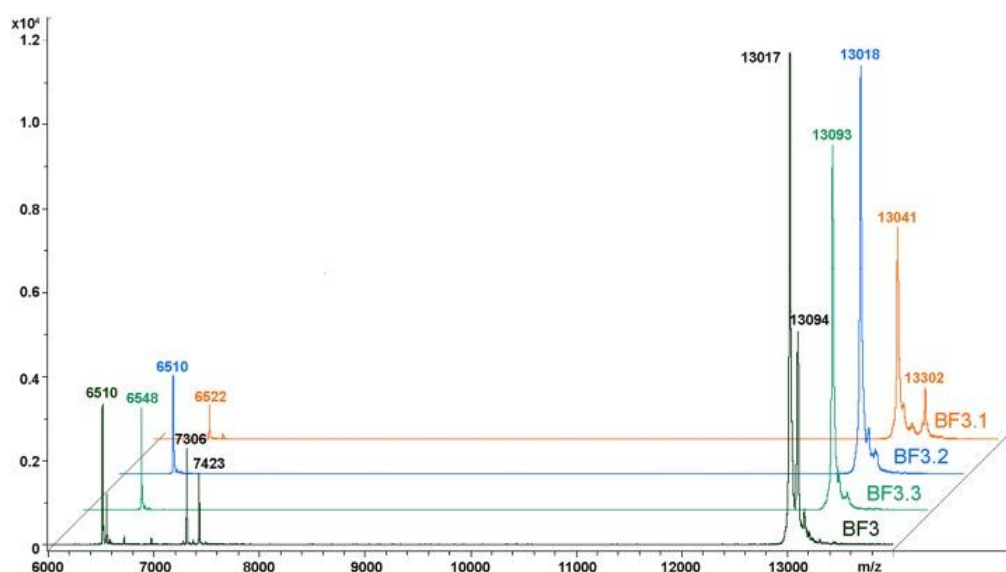
После лиофилизации фракции проверяли на цитотоксичность в отношении клеточных линий MCF-7 и A549 (Рис. 22). Было обнаружено, что только фракция BF3 способна проявлять цитотоксичность для обеих клеточных линий. Цитотоксический эффект фракции 3 зависел от времени и дозы. После 72 ч инкубации при концентрации 100 мкг/мл, процент жизнеспособности клеток MCF-7 снизился до 20% от контроля, а процент жизнеспособных клеток A549 - до 16% от контроля.



**Рисунок 22.** Цитотоксичность фракций, полученных из яда *V. fasciatus* с помощью гель-фильтрации и обращенно-фазовой хроматографии, в отношении линий клеток MCF-7 и

A549. Жизнеспособность клеток исследовали с помощью колориметрического анализа МТТ. Процент жизнеспособных клеток определяли путем сравнения с необработанным контролем. Все результаты представлены как среднее значение  $\pm$  SEM (стандартная ошибка среднего);  $n = 3$ . Достоверность различий между экспериментальной и контрольной группами была проанализирована с помощью t-критерия Стьюдента: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  и \*\*\* $p < 0,001$ . А – Е) BF1 – BF5 соответствуют фракциям 1–5 на Рис. 21А. BF – яд *B. fasciatus*. Ж – М) Фракции, полученные после обращенно-фазовой хроматографии (Рис. 21Б). BF3.1 – BF3.4 соответствуют фракциям 3.1–3.4 на Рис. 21Б. BF3 фракция 3 с Рис. 21А.

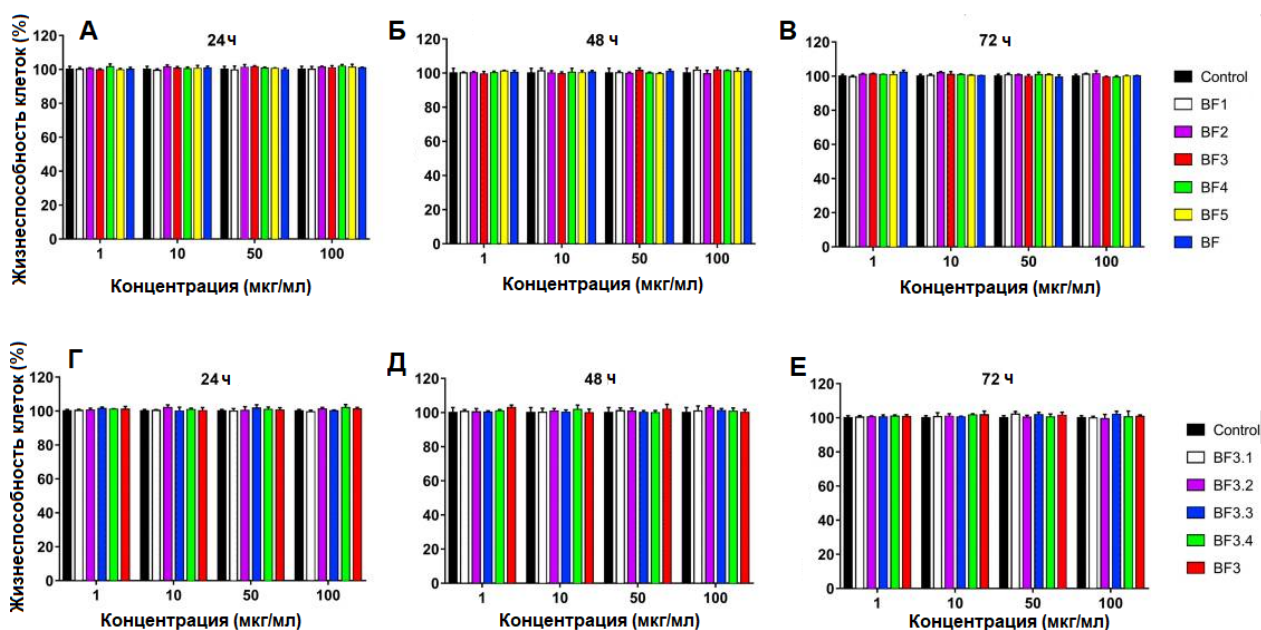
Анализ активной фракции BF3 с помощью масс-спектрометрии MALDI выявил присутствие нескольких белков (Рис. 23). Наблюдались интенсивные сигналы при  $m/z$  около 13000. В яде *B. fasciatus* только ФЛА2 могут обладать молекулярной массой в этом диапазоне. Сигналы с  $m/z$  около 6500 - это двухзарядные ионы одних и тех же белков, тогда как сигналы с  $m/z$  в диапазоне 7 300–7 400 могут соответствовать трехпетельным токсинам. Активная фракция 3 была далее разделена обращенно-фазовой хроматографией на колонке C18 и в результате были получены четыре фракции (Рис. 21Б). Полученные три основные фракции были проанализированы методом MALDI масс-спектрометрии (Рис. 23). Все проанализированные фракции показали однозарядный сигнал с  $m/z$  около 13000 и двухзарядный сигнал с  $m/z$  около 6500. Эти данные показывают, что фракции 3.2 и 3.3 содержат белки с молекулярными массами 13 018 и 13 093 Да, соответственно.



**Рисунок 23.** MALDI масс-спектроскопический анализ фракций яда *B. fasciatus*. Масс-спектрометрические измерения MALDI-TOF были выполнены с использованием масс-

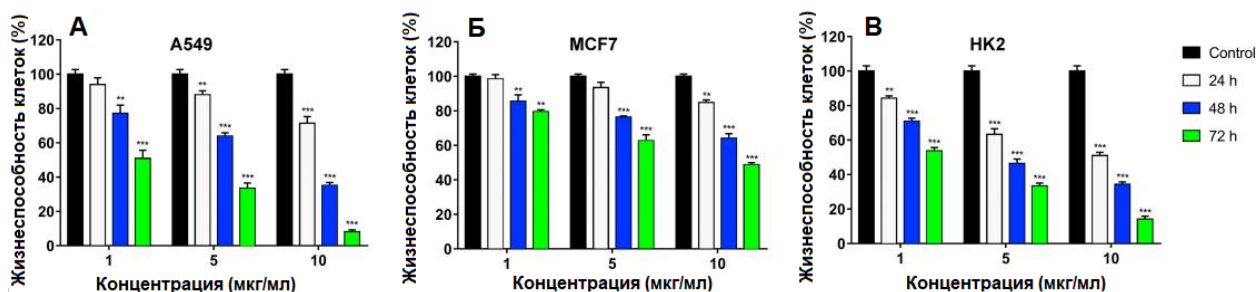
спектрометра Ultraflex TOF/TOF. Данные масс-спектрометрии обрабатывали с помощью программы Bruker Daltonics Flex Analysis 2.4. BF3 - фракция 3, полученная после гелевой фильтрации сырого яда на колонке Superdex® 75 10/300 GL. BF3.1, BF3.2 и BF3.3 - фракции 3.1, 3.2 и 3.3, соответственно, полученные с помощью обращенно-фазовой хроматографии гелевой фильтрационной фракции 3 на колонке Jupiter C18.

Далее, полученные фракции анализировали на цитотоксичность с использованием теста МТТ. Только фракция 3.3 проявила цитотоксичность для обеих тестируемых клеточных линий (Рис. 22Ж-М). Противоопухолевый эффект этой фракции усиливался с увеличением концентрации и времени инкубации. После 72 ч инкубации, при концентрации 100 мкг/мл фракции 3.3, процент жизнеспособности клеток MCF-7 снизился до 56,7% от контроля, а клеток A549 - до 57%. Все остальные фракции не вызывали гибель раковых клеток. Мы протестировали действие фракции 3.3 на нескольких других раковых клетках человека: клетки рака груди человека BT-474 и SK-BR-3, а также клетки рака предстательной железы человека PC-3 и LNCaP. Фракция 3.3 в концентрации 100 мкг/мл снижала жизнеспособность клеток BT-474, PC-3 и LNCaP на 39, 20 и 12% соответственно, но не влияла на клетки SK-BR-3. Интересно отметить, что ни неочищенный яд, ни какая-либо фракция, включая фракции 3 и 3.3, не оказала заметного воздействия на доброкачественные эпителиальные клетки почки человека HK2 через 24, 48 или 72 часа инкубации (Рис. 24).



**Рисунок 24.** Тест на цитотоксичность фракций, полученных из яда *B. fasiatus*, против нормальных клеток почки человека НК2. Жизнеспособность клеток исследовали с помощью колориметрического анализа МТТ. Процент жизнеспособных клеток определяли путем сравнения с необработанным контролем. Все результаты представлены как среднее значение  $\pm$  SEM (стандартная ошибка среднего). А – В) BF1 – BF5 соответствуют фракциям 1–5 на Рис. 21А. Г – Е) Фракции, полученные после обращенно-фазовой хроматографии (Рис. 21Б). BF3.1 – BF3.4 соответствуют фракциям 3.1–3.4 на Рис. 21Б. BF3 фракция 3 с Рис. 21А.

В химиотерапии человека, цисплатин является одним из наиболее активных противоопухолевых агентов, которые используются для лечения рака груди, легких, яичников и мочевого пузыря. Как и ожидалось, цисплатин в качестве положительного контроля проявлял цитотоксичность для всех клеток, включая нормальные клетки НК2 (Рис. 25).



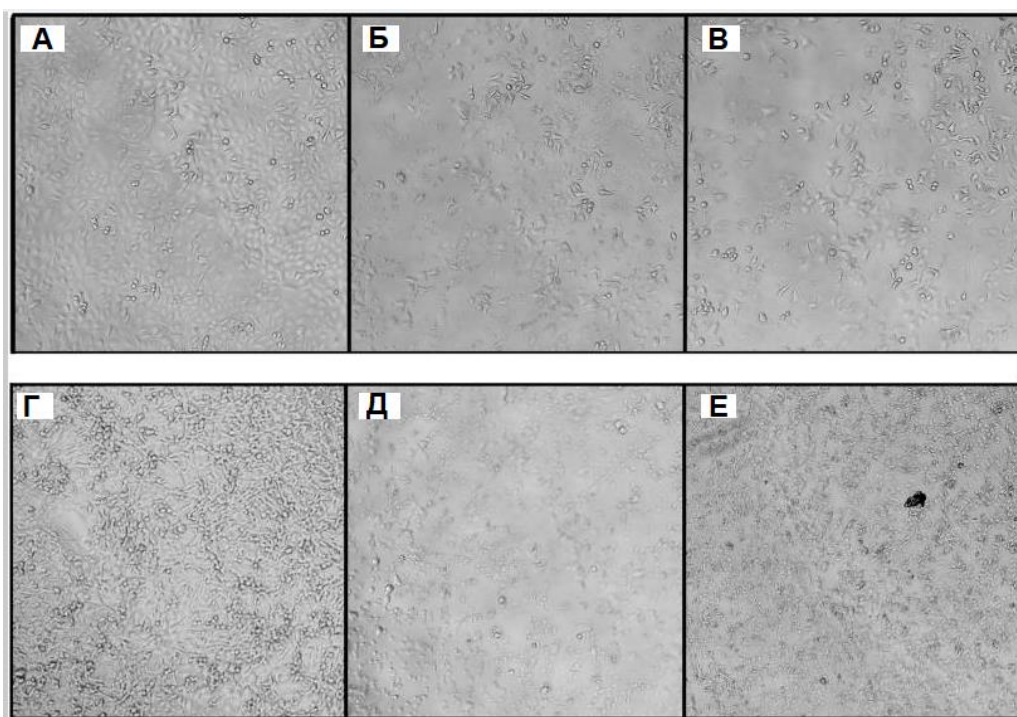
**Рисунок 25.** Цитотоксичность цисплатина для линий клеток человека A549 (А), MCF-7 (Б) и НК2 (В). Жизнеспособность клеток исследовали с помощью колориметрического анализа МТТ. Процент жизнеспособных клеток определяли путем сравнения с необработанным контролем. Все результаты представлены как среднее значение  $\pm$  SEM (стандартная ошибка среднего). Достоверность различий между экспериментальной и контрольной группами анализировалась с помощью t-критерия: двухсторонний тест при условии равных отклонений. \*\*  $p < 0,01$  и \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.3.2 Морфологические исследования клеток с использованием фазово-контрастной микроскопии

В ходе работы морфологические изменения клеток рака молочной железы человека MCF-7 и клеток рака легких человека A549, обработанных неочищенным ядом и фракциями *B. fasiatus*, были проанализированы с помощью фазово-контрастной микроскопии. В контрольной группе, необработанные клетки равномерно распределялись по дну культуральных планшетов и образовывали монослой (Рис. 26А,Г). Необработанные клетки



были однородными по размеру и выглядели удлинёнными. После воздействия яда и его фракций, клетки резко изменили свою морфологию. После обработки ядом или полученными фракциями яда, четко наблюдалось уменьшение клеток (гибель), потеря клеточной адгезии и снижение плотности клеток (Рис. 26). Форма клеток изменилась с удлинённой на округлую с увеличением межклеточного пространства. Клетки откреплялись от поверхности культуральных планшетов и плавали в среде. Подобные эффекты характерны для цитотоксических соединений.

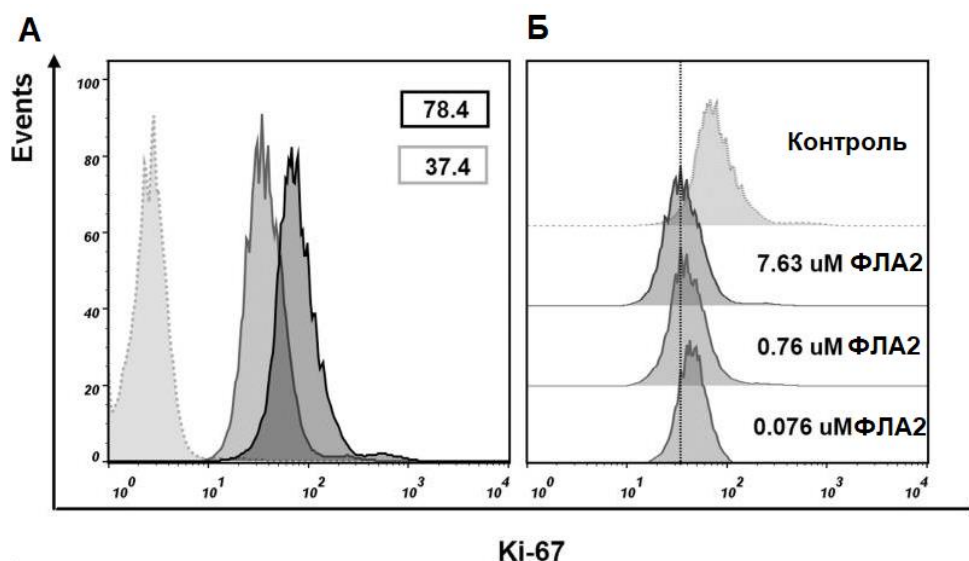


**Рисунок 26.** Морфологические изменения клеток A549 (А – В) и MCF-7 (Г – Е) после обработки фракциями BF3 (Б и Д) или BF3.3 (В и Е) в течение 72 ч, исследуемые с помощью фазово-контрастной микроскопии. Изменения морфологии клеток наблюдали с помощью микроскопа Zeiss Axio Vert 25C. Репрезентативные изображения клеток, необработанных (А и Г) или обработанных фракциями BF или BF3.3 при 100 мкг/мл.

### **3.3.3 Оценка пролиферации и апоптоза/некроза клеток MCF-7 под действием фракции BF7.3**

Чтобы выяснить, влияет ли выделенная ФЛА2, содержащаяся в фракции BF7.3, на пролиферацию клеток, мы оценили экспрессию Ki-67 в клетках MCF-7, обработанных этим белком. После обработки 7,63  $\mu$ M ФЛА2 в течение

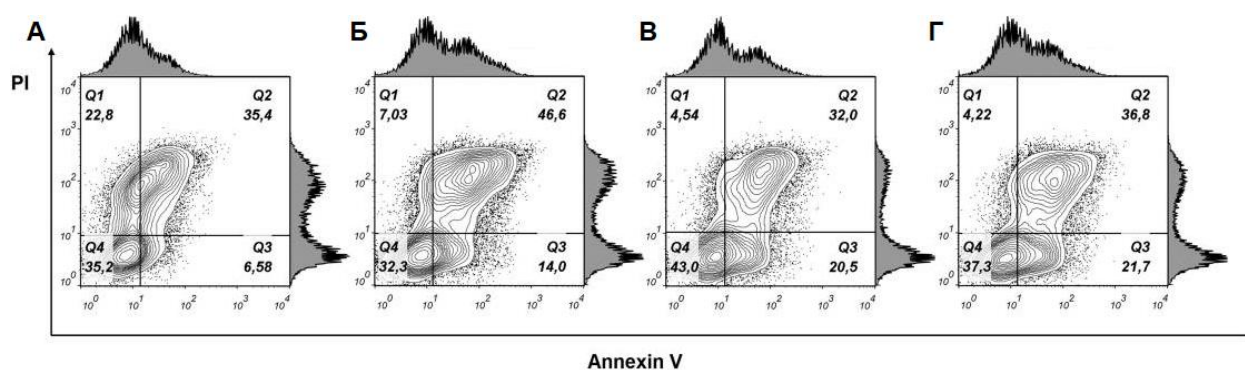
24 ч с использованием проточной цитометрии было обнаружено снижение доли Ki-67-положительных клеток (Рис. 27). Поскольку белок Ki-67 является маркером клеточной пролиферации, его снижение указывает на снижение пролиферации клеток MCF-7, обработанных ФЛА2. Заметные изменения в экспрессии Ki-67 наблюдались также при обработке клеток более низкими дозами ФЛА2.



**Рисунок 27.** Исследование экспрессии Ki-67 в клетках MCF-7 с помощью проточной цитометрии. Клетки обрабатывали ФЛА2 в течение 24 ч, затем производили окрашивание anti-Ki-67 и анализировали проточной цитометрией. Гистограммы и цифры в них показывают различия в уровне экспрессии Ki-67 в обработанных ФЛА2 и контрольных клетках. А) Гистограмма с серыми точками - изотипический контроль; черная гистограмма - контрольные клетки; серая гистограмма - клетки, обработанные 7.63  $\mu\text{M}$  ФЛА2. Цифры на гистограммах представляют среднюю интенсивность флуоресценции в популяции Ki-67 положительных клеток. Б) Изменения уровня экспрессии Ki-67 в контрольных клетках и клетках, обработанных различными дозами ФЛА2. Показано дозозависимое снижение уровня флуоресценции клеток с увеличением концентрации ФЛА2.

Чтобы проверить, подвергаются ли раковые клетки апоптозу или некрозу после обработки ФЛА2, клетки MCF-7 окрашивали флуоресцентно меченным аннексином V и йодидом пропидия (PI). При анализе клеток с использованием проточной цитометрии, окрашенные клетки разделяются на четыре группы, а именно жизнеспособные клетки (Аннексин V<sup>-</sup> / PI<sup>-</sup>), ранний апоптоз (Аннексин V<sup>+</sup> / PI<sup>-</sup>), поздний апоптоз (Аннексин V<sup>+</sup> / PI<sup>+</sup>) и некротические клетки (Аннексин V<sup>-</sup> / PI<sup>+</sup>). В клетках, обработанных ФЛА2 (7.63  $\mu\text{M}$  в течение 24 ч), обнаруживалось увеличение субпопуляций клеток

аннексин  $V^+ / PI^+$  и аннексин  $V^+ / PI^-$  (Рис. 28), что указывает на апоптотическую гибель клеток. После инкубации клеток с более низкими дозами ФЛА2, количество клеток, находящихся в раннем апоптозе незначительно увеличивалась, тогда как субпопуляция клеток с поздним апоптозом снижалась. Поскольку обработка ФЛА2 приводила к увеличению доли апоптотических клеток MCF-7, данное исследование показывает, что апоптоз является вероятным механизмом гибели клеток.



**Рисунок 28.** Анализ клеточного апоптоза/некроза с помощью проточной цитометрии на клетках MCF-7, обработанных различными дозами ФЛА в течение 24 ч. А) Необработанные клетки. Б-Г) Клетки, обработанные 7.63, 0.76 и 0.076  $\mu\text{M}$  ФЛА2, соответственно. Цифры в дот-плотах отображают количество жизнеспособных (Q4, Аннексин  $V^- / PI^-$ ), раннеапоптотических (Q3, Аннексин  $V^+ / PI^-$ ), поздних апоптотических (Q2, Аннексин  $V^+ / PI^+$ ) и некротических (Q1, Аннексин  $V^- / PI^+$ ) клеток. Воздействие ФЛА2 вызывает апоптоз в клеточной линии карциномы молочной железы MCF-7.

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

#### 3.4.1. Характеризация ФЛА2 выделенных из различных змей

В данной части работы исследовалось восемь образцов ФЛА2 из змеиных ядов. Две ФЛА2 были получены из яда крайта *Bungarus fasciatus*: BF-PLA2-II (фосфолипаза A2 II; GenBank AAK62361.1) и BF-PLA2-1 (основная фосфолипаза A2 1; UniProtKB Q90WA7), обе принадлежат к группе IA. Все остальные ФЛА2, испытанные в этой работе, принадлежат к группе IIA: Vur-PL2 (UniProtKB F8QN53), полученная из яда гадюки *V. ursinii renardi*. HDP-1 и HDP-2 были получены из яда гадюки *V. nikolskii*: это димеры, состоящие из

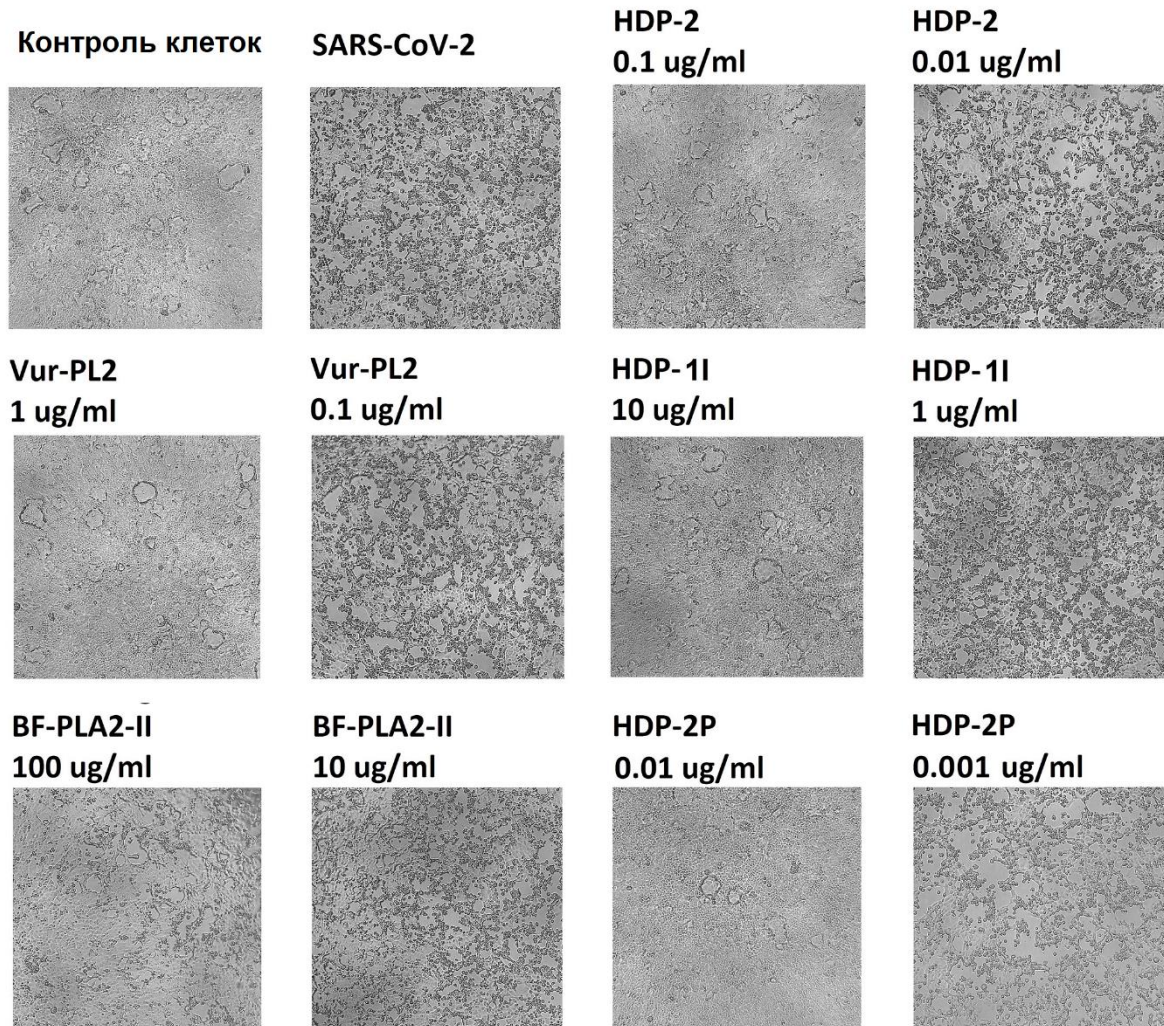
ферментативно активных субъединиц HDP-1P (UniProtKB Q1RP79) и HDP-2P (UniProtKB Q1RP78), соответственно, в сочетании с ферментативно неактивной HDP-1I (UniProtKB A4VBF0), общей для обоих димеров. Для дальнейших исследований HDP-2 была разделена на HDP-2P и HDP-1I с использованием обращенно-фазовой хроматографии. Неактивная форма HDP-2P была также получена путем обработки HDP-2P с помощью 4-бромфенацилбромида, который селективно алкилирует остаток His в активном центре. Этот модифицированный аналог был очищен обращенно-фазовой ВЭЖХ (выход целевого производного = 45%) и проанализирован с помощью масс-спектрометрии, которая показала увеличение массы на 198 Да. Тестирование ферментативной активности модифицированной HDP-2P (HDP-2P inact) показало, что фосфолиполитическая активность снизилась примерно в 2200 раз.

#### ***3.4.2. Антивирусная активность змеиных ФЛА2 против SARS-CoV-2***

Исследование ингибирования SARS-CoV-2-индуцированного цитопатического эффекта (CPE) на клетках Vero E6 использовали для анализа противовирусной активности пяти ФЛА2 из змеиных ядов, две из которых, HDP-1 и HDP-2, были димерными, а также двух субъединиц HDP-2 (HDP-1I и HDP-2P). Результаты экспериментов показывают, что инфекция SARS-CoV-2 приводит к выраженным морфологическим изменениям клеток, включая округление, дезагрегацию и цитолиз клеток (Рис. 28). Было обнаружено, что все пять протестированных ФЛА2 обладали противовирусной активностью, поскольку морфологические изменения, вызванные вирусом, предотвращались с помощью ФЛА2 (Рис. 28). Две димерных ФЛА2 HDP-1 и HDP-2 показали самую сильную противовирусную активность, ингибируя на ~ 50% CPE в концентрации 0,1 мкг/мл (3,6 нМ) (Рис. 29А и Б, таблица 1). Vur-PL2 была менее активной, ингибируя CPE на 50% при 1 мкг/мл (74 нМ), в то время как BF-PLA2-II и BF-PLA2-1 показали самый низкий уровень



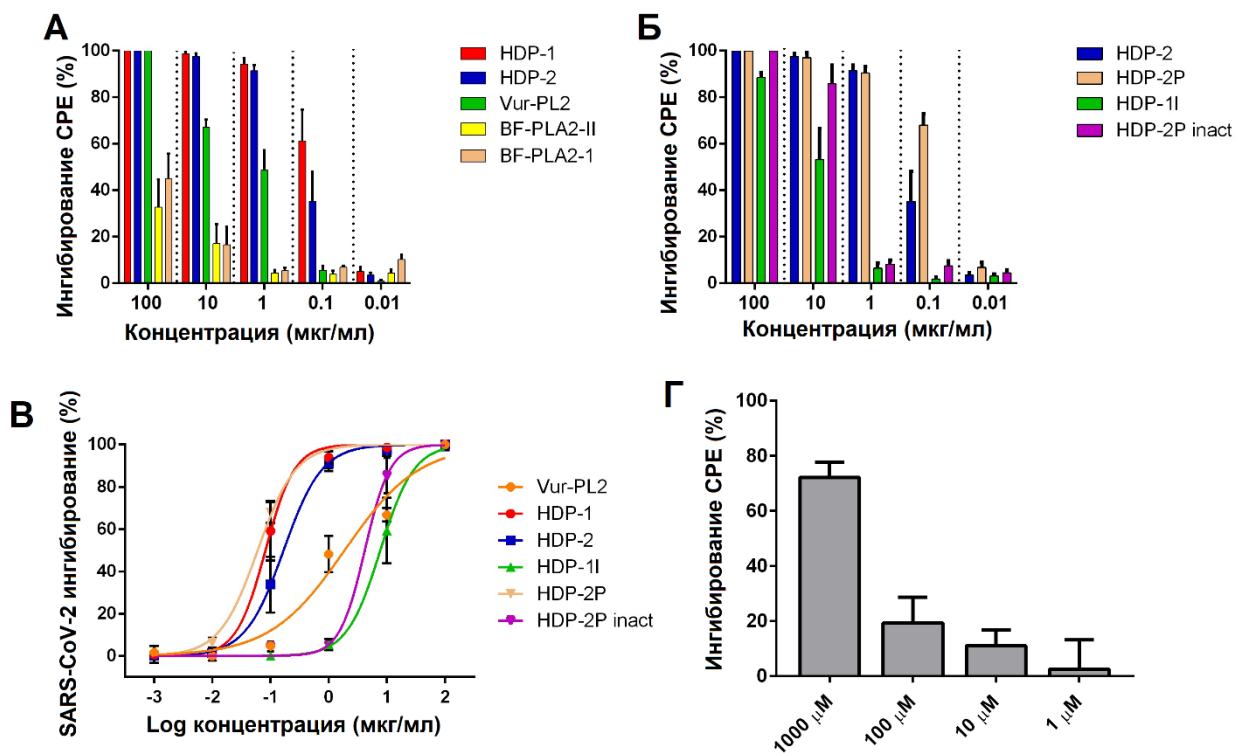
активности, ингибируя СРЕ менее чем на 50% при 100 мкг/мл (7,6 мМ) (Рис. 29А).



**Рисунок 28.** Ингибирование цитопатического действия SARS-CoV-2 на клетках Vero E6 с помощью змеиных ФЛА2. Клетки Vero E6 были инфицированы SARS-CoV-2 при 100 TCID<sub>50</sub> (50% тканевая цитопатическая инфекционная доза) в присутствии ФЛА2 в указанных концентрациях. Фотографии сделаны через 72 ч после заражения.

Затем была изучена противовирусная активность двух субъединиц ФЛА2 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 в ~ 100 раз ниже активность (Рис. 29Б и В). Такие результаты позволяют предположить, что противовирусная активность может быть связана с фосфолиполитической активностью. Чтобы определить вклад фосфолипазной активности субъединицы HDP-2P в ингибирование SARS-CoV-2, ферментативная

активность этой субъединицы ингибировалась химической модификацией активного центра (HDP-2P inact): после такой модификации, противовирусная активность снизилась в 70 раз (Рис. 29Б, таблица 1). Поскольку ФЛА2 катализируют гидролиз в sn2-положении мембранных глицерофосфолипидов до лизофосфолипидов и свободных жирных кислот, в основном до арахидоновой кислоты (АК), была оценена активность АК против СРЕ SARS-CoV-2. АК подавляла СРЕ, но только при высоких концентрациях (Рис. 29Г).



**Рисунок 29.** ФЛА2 из змеиного яда обладают высокой ингибирующей активностью против цитопатического действия SARS-CoV-2 на клетках Vero E6. Клетки Vero E6 инфицировали SARS-CoV-2 при 100 TCID<sub>50</sub> в присутствии ФЛА в указанных концентрациях в течение 72 ч. Затем, определяли ингибирование СРЕ с помощью колориметрического анализа с МТТ. А) Влияние ФЛА2 из различных ядов на СРЕ SARS-CoV-2. Б) Влияние HDP-2 и ее субъединиц на СРЕ SARS-CoV-2. В) Дозозависимые кривые для определения значений половинной максимальной ингибирующей концентрации (IC<sub>50</sub>). Г) Арахидоновая кислота (АК) слабо подавляет СРЕ SARS-CoV-2 на клетках Vero E6. Результаты репрезентативны как минимум для пяти биологически независимых образцов (по трем независимым экспериментам) и представлены как среднее ± SD.

**Таблица 1.** Значения 50% ингибирующей концентрации (IC<sub>50</sub>) для исследуемых ФЛА2 против SARS-CoV-2.

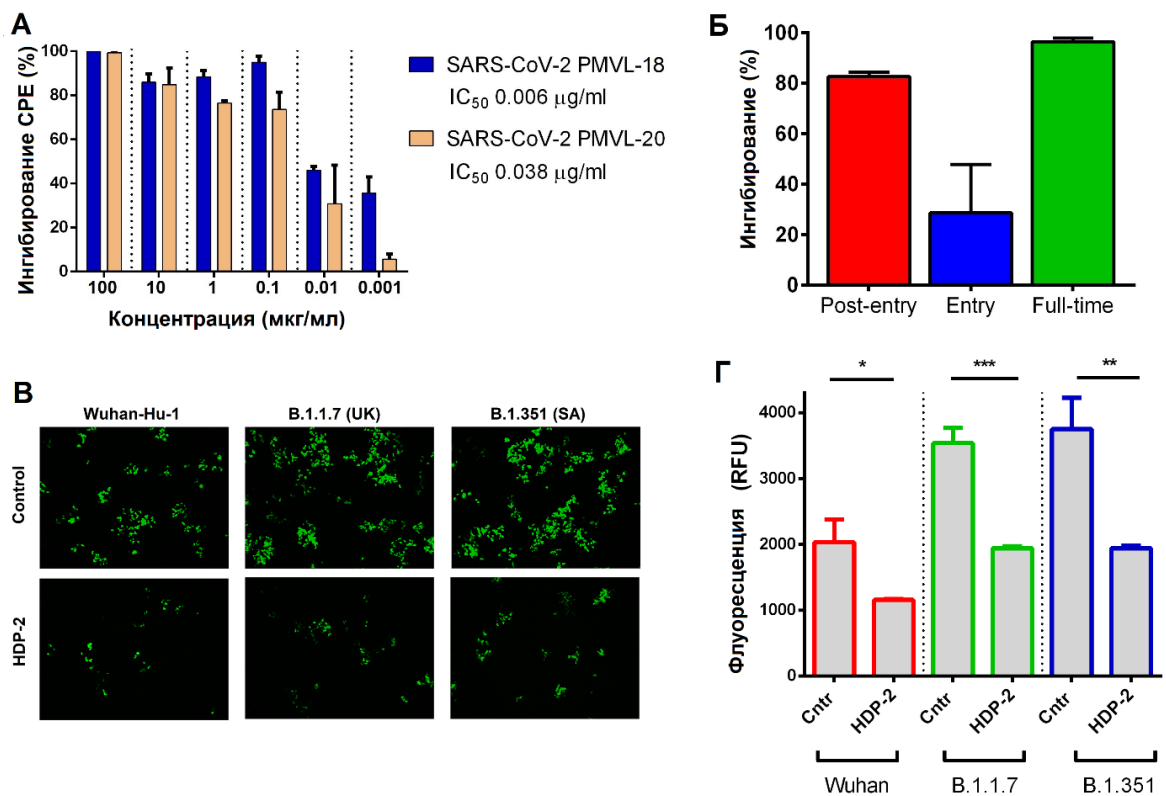
<b>ФЛА2</b>	<b>IC<sub>50</sub>, мкг/мл</b>	<b>95% CI<sup>a</sup>, мкг/мл</b>
<b>Vur-PL2</b>	1.88	1.27-2.79
<b>HDP-1</b>	0.08	0.058-0.12
<b>HDP-2</b>	0.17	0.12-0.24
<b>HDP-1I</b>	7.71	5.28-11.27
<b>HDP-2P</b>	0.06	0.05-0.07
<b>HDP-2P inact</b>	4.17	3.01-5.77

<sup>a</sup>CI – доверительный интервал

В последние месяцы появился ряд генетически различных вариантов SARS-CoV-2, некоторые из них связаны с повышенной скоростью распространения вируса. Чтобы определить, проявляют ли ФЛА2 противовирусную активность против таких вирусов, HDP-2 была протестирована с использованием двух изолятов SARS-CoV-2, содержащих делеции и мутации в гликопротеине S. HDP-2 продемонстрировала высокую противовирусную активность со значениями IC<sub>50</sub> 0,006 (0,22 нМ) и 0,038 мкг/мл (1,4 нМ) для штаммов hCoV-19/PMVL-18 и hCoV-19/PMVL-20 SARS-CoV-2 соответственно (Рис. 30А).

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 определения вирусной нагрузки с использованием количественной ПЦР в реальном времени (qOT-ПЦР) (Рис. 30Б). 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». Затем было исследовано, может ли HDP-2 блокировать проникновение псевдовирюсов SARS-CoV-2 несущих ген GFP, и проникающих в клетку посредством связывания с ACE2 рецептором (Рис. 30В и Г). Для этого, псевдо-SARS-CoV-2 (представляющий эталонный штамм Wuhan, либо линию B.1.1.7 (UK, Великобритания) и B.1.351 (SA, Южная Африка)) инкубировали с HDP-2,

после чего смесь добавляли к клеткам 293Т, экспрессирующим рецептор ACE2 человека (клетки 293Т/ACE2). Через 72 ч после заражения, проводили детекцию флуоресценции GFP в клетках. При концентрации 10 мкг/мл (3,6  $\mu\text{M}$ ) HDP-2 показала  $\sim 50\%$  ингибирование проникновения псевдо-SARS-CoV-2 в клетки 293Т/ACE2 (Рис. 30Г) для всех используемых псевдовирусов, что указывает на то, что ФЛА2 может мешать прикреплению SARS-CoV-2 к клеткам.



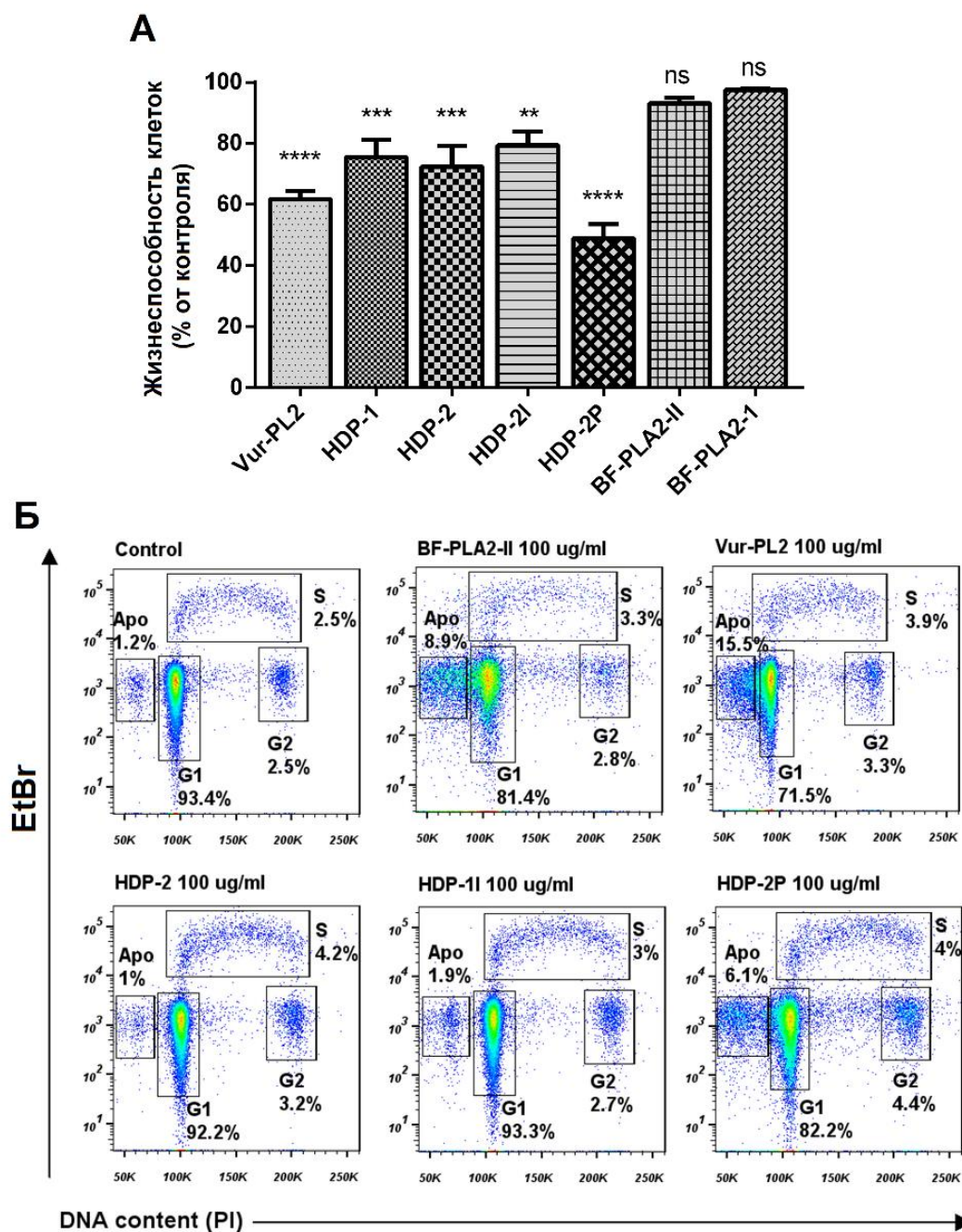
**Рисунок 30.** ФЛА2 проявляют противовирусную активность против вирусов, содержащих мутации, и ингибируют различные стадии цикла репликации SARS-CoV-2. А) Анализ ингибирования CPE. Клетки Vero E6 инфицировали штаммом SARS-CoV-2 PMVL-19 или PMVL-20 в присутствии различных концентраций HDP-2 в течение 72 ч. Затем, определяли ингибирование CPE с помощью анализа с МТТ. Б) Анализ ингибирования цикла репликации SARS-CoV-2. Клетки Vero E6 инфицировали SARS-CoV-2 при множественности инфицирования (MOI) 0.01, и количество вируса в супернатантах инфицированных клеток количественно определяли с помощью qOT-ПЦР. В) 293Т/ACE2 были инфицированы различными псевдо-SARS-CoV-2-GFP вирусами в присутствии PBS (контроль) или HDP-2 (10 мкг/мл). Репрезентативные изображения флуоресцентной микроскопии клеток 293Т/ACE2, инфицированных псевдо-SARS-CoV-2 и обработанных HDP-2. Шкала 100 мкм. Г) Инфекционность псевдо-SARS-CoV-2 на клетках 293Т/ACE2 была количественно определена путем измерения флуоресценции GFP. t-критерий Стьюдента: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Для всех экспериментов результаты показаны как среднее значение  $\pm$  SD для  $n = 3$  или 5 биологически независимых образцов. RFU - относительные единицы флуоресценции.

### ***3.4.3 Исследование цитотоксичности ФЛА2 и их влияния на пролиферацию клеток Vero E6***

Чтобы оценить прямое влияние ФЛА2 на клетки Vero E6, была изучена их цитотоксичность. ФЛА2 немного снижали жизнеспособность клеток, но не вызывали морфологических изменений клеточного монослоя. Наивысшую, хотя и умеренную цитотоксичность, проявляли Vur-PL2 и HDP-2P, которые при 100 мкг/мл (7,4 и 3,6  $\mu\text{M}$ , соответственно) снижали жизнеспособность клеток в среднем на 38% и 51% соответственно (Рис. 31А). Только HDP-2P в максимальной использованной концентрации (100 мкг/мл; 7,2  $\mu\text{M}$ ) обладала выраженной цитотоксичностью с изменением морфологии клеток.

Влияние ФЛА2 на пролиферацию клеток также исследовалось с помощью анализа клеточного цикла. Для этого, максимальная концентрация (100 мкг/мл) каждой ФЛА2 была добавлена к клеткам Vero E6, которые затем инкубировали в течение 72 ч (Рис. 31Б). Анализ обработанных клеток с помощью проточной цитометрии показал, что большинство этих клеток находились в фазе G1, а небольшой процент - в ранней фазе S и фазе G2. Профили клеточного цикла для клеток, обработанных ФЛА2, не сильно отличались от профиля для необработанных клеток, за исключением того, что обработка BF-PLA2-II, Vur-PL2 и HDP-2P приводила к небольшому увеличению процента апоптотических клеток.





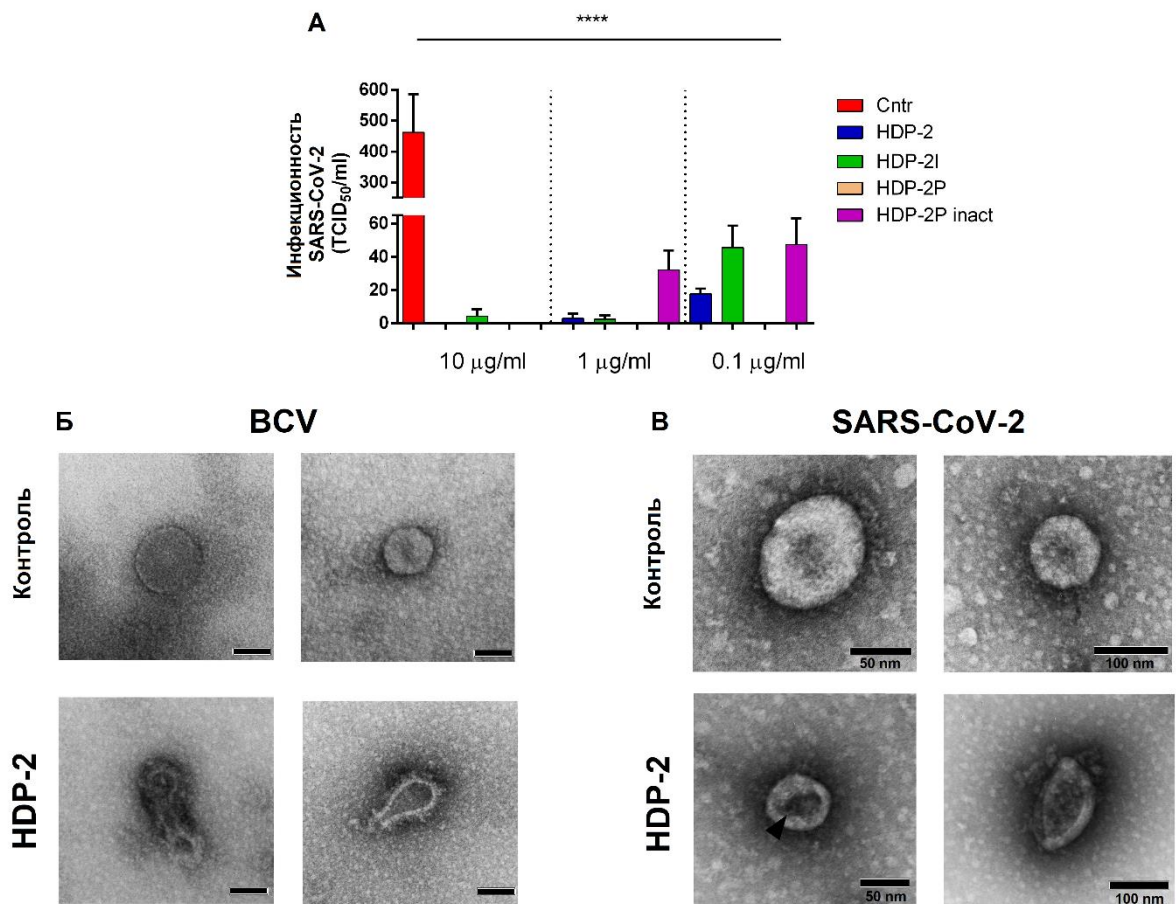
**Рисунок 31.** ФЛА2 из змеиного яда проявляют низкую цитотоксичность по отношению к клеткам Vero E6. А) Данные цитотоксичности для всех протестированных ФЛА2 в концентрации 100 мкг/мл, полученные в трех независимых экспериментах с двумя измерениями. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  SD. ANOVA тест с Turkey post hoc тестом: \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; ns  $p > 0,05$ . Б) Анализ клеточного цикла с использованием проточной цитометрии. Клетки Vero E6 обрабатывали различными ФЛА2 в концентрации 100 мкг/мл. После 72 ч инкубации, клетки обрабатывали бромдезоксисуридином (BrdU), а затем HCl, и окрашивали FITC-меченными антителами против BrdU и йодидом пропидия (PI), после чего анализировали проточной цитометрией. Vero E6, обработанные PBS, использовали в качестве контроля. Числа показывают процентное соотношение клеток в фазе S (вверху) и фазе G1 или G2 (внизу) на каждом дот-плоте. Apo - апоптотические клетки.

#### ***3.4.4 Исследование влияния ФЛА2 на морфологию коронавирусов и их вирулицидную активность***

Чтобы выяснить, проявляют ли ФЛА2 свою противовирусную активность через фосфолиполитическое действие на клеточную или вирусную мембрану, была проанализирована вирулицидная активность HDP-2 и HDP-2P (которые проявляли наивысшую противовирусную активность), а также HDP-1I и HDP-2P inact. Для исследования прямого ингибирующего действия на вирусные частицы, SARS-CoV-2 обрабатывали различными концентрациями (0,1–10 мкг/мл) ФЛА2 или PBS, и результаты сравнивали с помощью визуальной оценки CPE на клетках Vero E6 (Рис. 32А). Полное подавление инфекционности SARS-CoV-2 наблюдалось, когда исходный вирус обрабатывали HDP-2P даже в концентрации 0,1 мкг/мл. 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, что подтверждает гипотезу о том, что HDP-2 может действовать эффективно только тогда, когда она сохраняет фосфолиполитическую активность.

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. 32Б). Обработанная с помощью ФЛА2 вирусная суспензия содержала две формы вирионов: вирионы с частично разрушенными мембранами и дефектной морфологией или вирионы с полностью разрушенными мембранами (дезинтегрированные частицы).

Аналогичные эффекты HDP-2 наблюдались и на SARS-CoV-2 (Рис. 32В), поскольку вирионы, обработанные HDP-2, содержали пустую вирусную оболочку, проницаемую для отрицательного окрашивания (Рис. 32В). Такие повреждения вирионов, вероятно, вызваны гидролизом липидов в вирусной мембране.

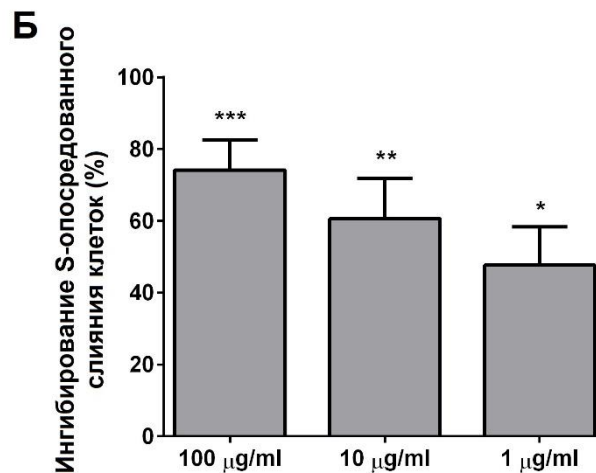
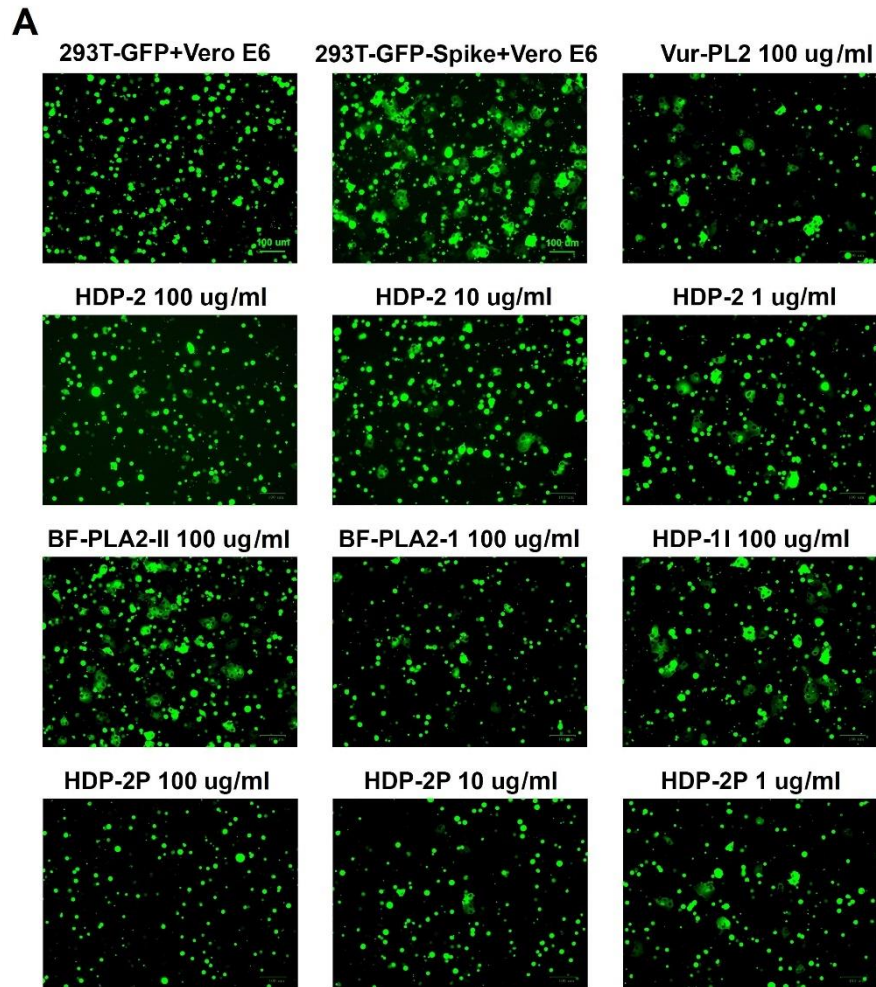


**Рисунок 32.** Димерная ФЛА2 HDP-2 и ее субъединицы HDP-2P и HDP-1I обладают высокой вирулицидной активностью, инактивируют коронавирусы и разрушают его мембрану. А) Вирулицидная активность: SARS-CoV-2 ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>) инкубировали с последовательными десятичными разведениями ФЛА2 в течение 1 ч при 37°C. Обработанные вирусы использовали для заражения клеток Vero E6. Инфекционность вируса рассчитывали по снижению титра после обработки ФЛА2 по сравнению с необработанным вирусом. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  SD трех независимых экспериментов и проанализированы с помощью ANOVA теста с Turkey post hoc тестом: \*\*\*\*  $p < 0,0001$  при всех концентрациях ФЛА2 по сравнению с контролем. Cntr - контроль. Б и В) С помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) было обнаружено, что HDP-2 нарушает целостность вирусной оболочки и изменяет морфологию вируса. На В) стрелка показывает накопление контрастирующего материала внутри вириона. Вирусные частицы, подвергшиеся воздействию HDP-2, демонстрируют разрушенную оболочку и, как следствие, измененную морфологию вирусных частиц. В Б) масштаб 50 нм.



### ***3.4.5 Оценка влияния ФЛА2 на гликопротеин S-опосредованное слияние клеток***

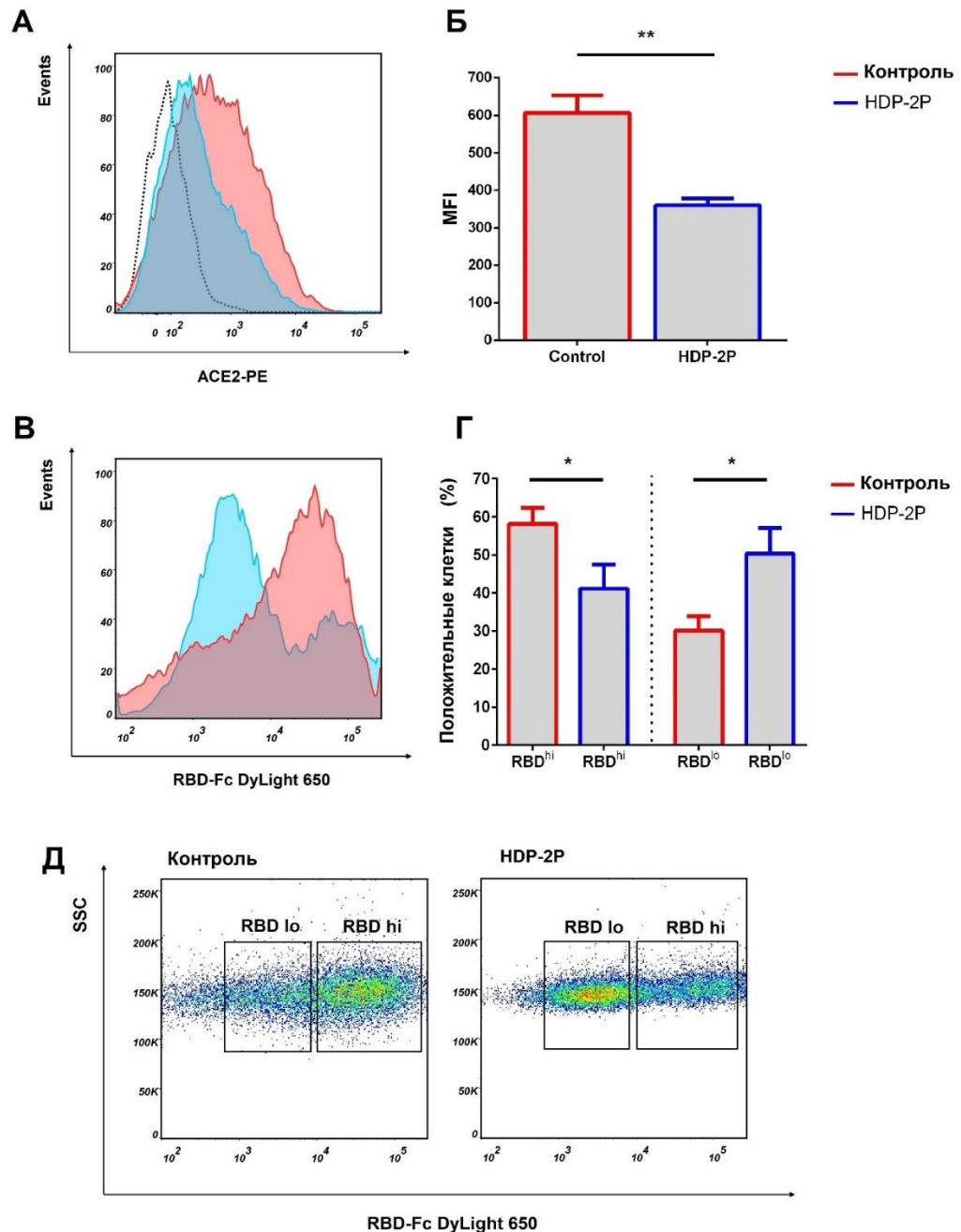
Чтобы изучить слияние клеток, вызванное взаимодействием гликопротеина S с рецептором ACE2, были использованы клетки 293Т, экспрессирующие зеленый флуоресцентный белок (GFP) и гликопротеин S SARS-CoV-2 (293Т-GFP-Spike), а также клетки Vero E6, экспрессирующие ACE2. После совместного культивирования эффекторных клеток 293Т-GFP-Spike и клеток-мишеней Vero E6 в присутствии пяти ФЛА2, количество слитых клеток подсчитывали с помощью флуоресцентного микроскопа. Полученные данные показали, что HDP-1 и HDP-2 ингибируют опосредованное гликопротеином S слияние клеток на ~ 50% при 1 мкг/мл и на 70% при 100 мкг/мл (Рис. 33А и Б). HDP-2Р при 100 мкг/мл полностью блокировала слияние клеток (Рис. 33А). Vur-PL2 и BF-PLA2-II при 100 мкг/мл не показали значительной активности.



**Рисунок 33.** ФЛА2 ингибируют слияние клеток, вызванное гликопротеином S SARS-CoV-2. А) Изображения слившихся клеток, опосредованных гликопротеином S после 2 ч инкубации в присутствии различных концентраций ФЛА2. Шкала 100 мкм. Б) Процент ингибирования слияния клеток в присутствии HDP-2. Слияние клеток с клетками рассчитывали относительно количества слитых клеток в лунках, не обработанных HDP-2. Результаты получены в двух независимых экспериментах. Данные выражены как среднее  $\pm$  SD. ANOVA тест с Turkey post hoc тестом: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

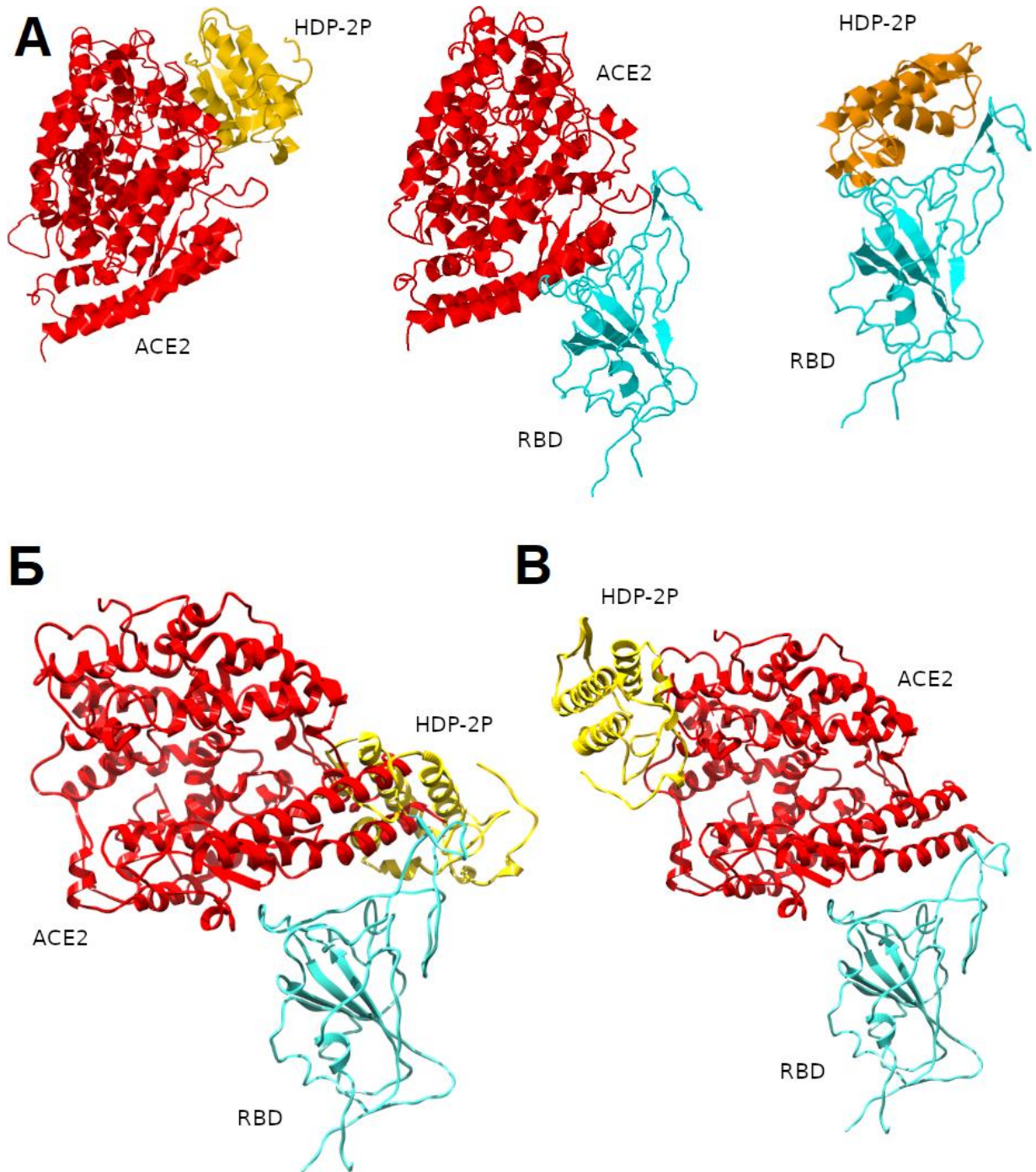
### ***3.4.6 Исследование ингибирующей активности субъединицы HDP-2P на связывание anti-ACE2 антител и рецептор-связывающего домена (RBD) гликопротеина S с ACE2 рецептором***

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 293T/ACE2 (Рис. 34 А, Б). Связывание этого антитела с ACE2 на клетках снижалось в 2 раза в присутствии HDP-2P, что указывает на то, что HDP-2P связывается с ACE2 рецепторами. Чтобы подтвердить этот вывод, далее был проанализирован ингибирующий эффект HDP-2P на связывание рецептор-связывающего домена SARS-CoV-2 (RBD) с рецептором ACE2 на клетках 293T/ACE2 с использованием проточной цитометрии (Рис. 34 В, Г). При окрашивании клеток было обнаружено две популяции, которые различались по интенсивности флуоресценции, обладающие высокой ( $RBD^{hi}$ ) и низкой ( $RBD^{lo}$ ) степенью флуоресценции при связывании RBD (Рис. 34Д). Хотя большинство клеток в контроле были  $RBD^{hi}$ , в популяции клеток, обработанной HDP-2P, наблюдалось увеличение процента клеток  $RBD^{lo}$  и уменьшение количества клеток  $RBD^{hi}$ . Таким образом, обработка HDP-2P уменьшала количество RBD, связанного клеткой, что указывает на ингибирование связывания белка RBD с рецептором ACE2.



**Рисунок 34.** HDP-2P снижает связывание антитела против ACE2 и белка RBD с рецептором ACE2 в клетках 293T/ACE2. А, Б) Ингибирование связывания антитела против ACE2 с клетками 293T/ACE2 с помощью HDP-2P. Клетки 293T/ACE2 инкубировали со 100 мкг/мл или без (контроль) HDP-2P в течение 30 мин и окрашивали с использованием конъюгированных с фикоэритрином (PE) антител против человеческого ACE2. MFI - средняя интенсивность флуоресценции. В,Г) Клетки инкубировали с PBS (контроль) или HDP-2P. Затем добавляли белок RBD, слитый с человеческим Fc, на 1 ч. После отмывки связывание RBD детектировали с использованием вторичных антител против Fc, конъюгированных с DyLight 650. Д) Репрезентативный профиль связывания RBD в контрольных клетках и клетках, обработанных HDP-2P. Показаны популяции клеток, связывающие высокое (RBD<sup>hi</sup>) и низкое (RBD<sup>lo</sup>) количество RBD. Процент положительных клеток определяли с помощью проточной цитометрии. t-критерий Стьюдента: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Результаты представляют не менее трех независимых определений и выражены как среднее  $\pm$  SD.

В дальнейшем был проведен анализ возможных взаимодействий между каталитически активной субъединицей HDP-2P и ACE2 или RBD SARS-CoV-2 с применением методов молекулярного моделирования. Молекулярное моделирование проводилось с использованием гомологической модели HDP-2P, которая была создана на веб-сервере Swissmodel [207]. Результирующие структуры соответствующих комплексов RBD и ACE2 с субъединицей HDP-2P были подвергнуты локальной оптимизации стыковки на веб-сервере Rosetta-2 [208]. Как ACE2, так и RBD были предсказаны как потенциальные объекты для связывания с субъединицей HDP-2P со значениями функции оценки лучше, чем у контрольного комплекса ACE2-RBD (Рис. 35 А). Оценка алгоритма Розетты составила -578,669 и -250,419 для взаимодействия ACE2 и RBD с HDP-2P, соответственно, против -248,931 для контрольного комплекса. Предполагаемый комплекс HDP-2P с RBD характеризуется положением фосфолипазы вблизи структурно неупорядоченной петли, которая, согласно рентгеновским структурам, взаимодействует с ACE2. Это частичное перекрытие (Рис. 35 Б) между интерфейсами связывания HDP-2P и ACE2 на RBD может объяснять некоторые прямые эффекты фосфолипазы на прикрепление вирусов к клеткам. С другой стороны, предполагаемый комплекс HDP-2P с ACE2 демонстрирует взаимодействие при открытии каталитической щели. Это взаимодействие было оценено алгоритмами Розетты как наиболее энергетически выгодное из описанных здесь. Однако интерфейсы связывания HDP-2P и RBD с ACE2 не пересекаются (Рис. 35 В), таким образом, подтверждая только косвенные эффекты на прикрепление вируса.



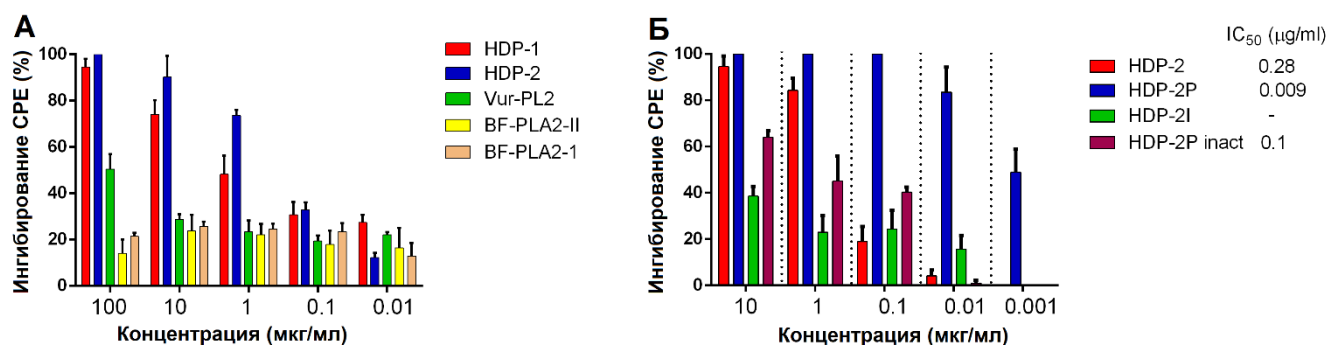
**Рисунок 35.** Молекулярное моделирование для предполагаемых комплексов ACE2 (красный), HDP-2P (золотой) и RBD (бирюзовый). А) Глобальный поиск начальных положений связывания с помощью алгоритма Frodock дал предполагаемые структуры комплексов HDP-2P с ACE2 (левая панель) и RBD (правая панель). Б) Розетта оптимизированный интерфейс связывания между HDP-2P и RBD пересекается с поверхностью связывания ACE2-RBD, что, возможно, препятствует взаимодействию RBD с ACE2; В) Розетта оптимизированный интерфейс связывания между HDP-2P и ACE2 не пересекается с поверхностью связывания ACE2-RBD. HDP-2P взаимодействует при открытии каталитической щели ACE2, что подразумевает отсутствие прямого взаимодействия между вирусным белком и его клеточным аналогом. Однако, связывание рядом с активным ферментативным центром может оказывать косвенное влияние на начальные стадии вирусной инфекции.



### 3.5 Исследование анти-ВИЧ активности змеиных ФЛА2

#### 3.5.1 Антиретровирусная активность змеиных ФЛА2 против ВИЧ дикого типа и псевдовирусов различных субтипов

В ходе исследования змеиные ФЛА2, представленные в пункте 3.4.1, были протестированы на противовирусную активность против ВИЧ-1. Противовирусный эффект ФЛА2 оценивался в отношении референс-штамма ВИЧ-1<sub>ШВ</sub> с использованием клеток МТ-4. Мономерные ФЛА2 относящиеся к группе IA, такие как BF-PLA2-II и BF-PLA2-1 (Рис. 36А), не проявляли активности против ВИЧ-1. ФЛА2 из группы ПА - Vur-PL2, показала умеренную активность против ВИЧ-1, подавляя инфекцию на ~ 50% при 100 мкг/мл. Было обнаружено, что димерные ФЛА2 HDP-1 и HDP-2 обладают наиболее высоким противовирусным эффектом и ингибируют репликацию ВИЧ-1<sub>ШВ</sub> со значениями IC<sub>50</sub> 0,67 и 0,28 мкг/мл соответственно (Рис. 36А и Б). Все исследованные ФЛА2 не проявили цитотоксичности в отношении клеток МТ-4 при концентрации 100 мкг/мл.



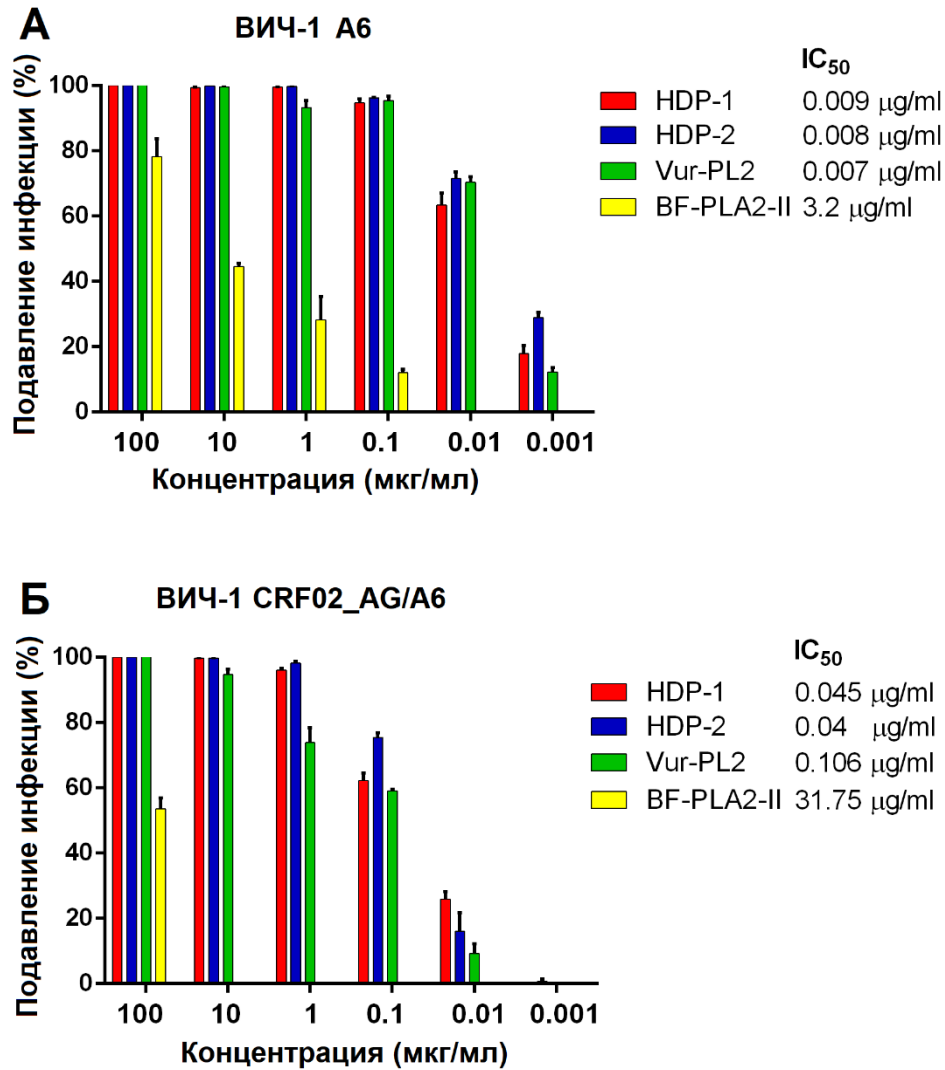
**Рисунок 36.** Противовирусная активность ФЛА2 против ВИЧ-1<sub>ШВ</sub>. К клеткам МТ-4 добавляли различные разведения ФЛА2 с последующей инокуляцией ВИЧ-1 при 100TCID<sub>50</sub>. Ингибирование CPE определяли с помощью МТТ теста через 5 дней после заражения. А) Активность пяти исследованных ФЛА2 против ВИЧ-индуцированного CPE. Б) Противовирусная активность димерной ФЛА2 HDP-2 и ее субъединиц против ВИЧ-1. Результаты представляют не менее трех независимых экспериментов. Значения на рисунках отображены как среднее ± SEM.

Чтобы определить, требуется ли каталитическая активность ФЛА2 для ее ингибирующего действия против ВИЧ-1, ферментативно активная

субъединица HDP-2P (из димерной HDP-2), фосфолиполитическая активность которой впоследствии ингибировалась химической модификацией активного центра, и ферментативно неактивная субъединица HDP-1I были протестированы в модели экспериментальной ВИЧ-инфекции. HDP-1I показала слабую активность против ВИЧ-1 (Рис. 36Б). 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. 36Б).

Далее, противовирусные эффекты ФЛА2 были исследованы путем измерения активности репортерного гена  $\beta$ -Gal с использованием псевдовирuses ВИЧ-1, представляющих суб-субтип А6 и циркулирующую рекомбинантную форму CRF02\_AG/A6 на клетках-мишенях TZM-bl, экспрессирующих рецептор CD4 и ко-рецепторы CXCR4 и CCR5. Все протестированные ФЛА2 показали высокую активность против псевдовируса ВИЧ-1, представляющего суб-субтип А6 (Рис. 37А). Противовирусный эффект ФЛА2 был значительно снижен при исследовании с использованием псевдовируса ВИЧ-1, который представляет собой циркулирующую рекомбинантную форму CRF02\_AG/A6 (Рис. 37Б), что позволяет предположить, что противовирусный эффект против разных подтипов ВИЧ-1 может быть связан с различием в строении оболочки вируса.

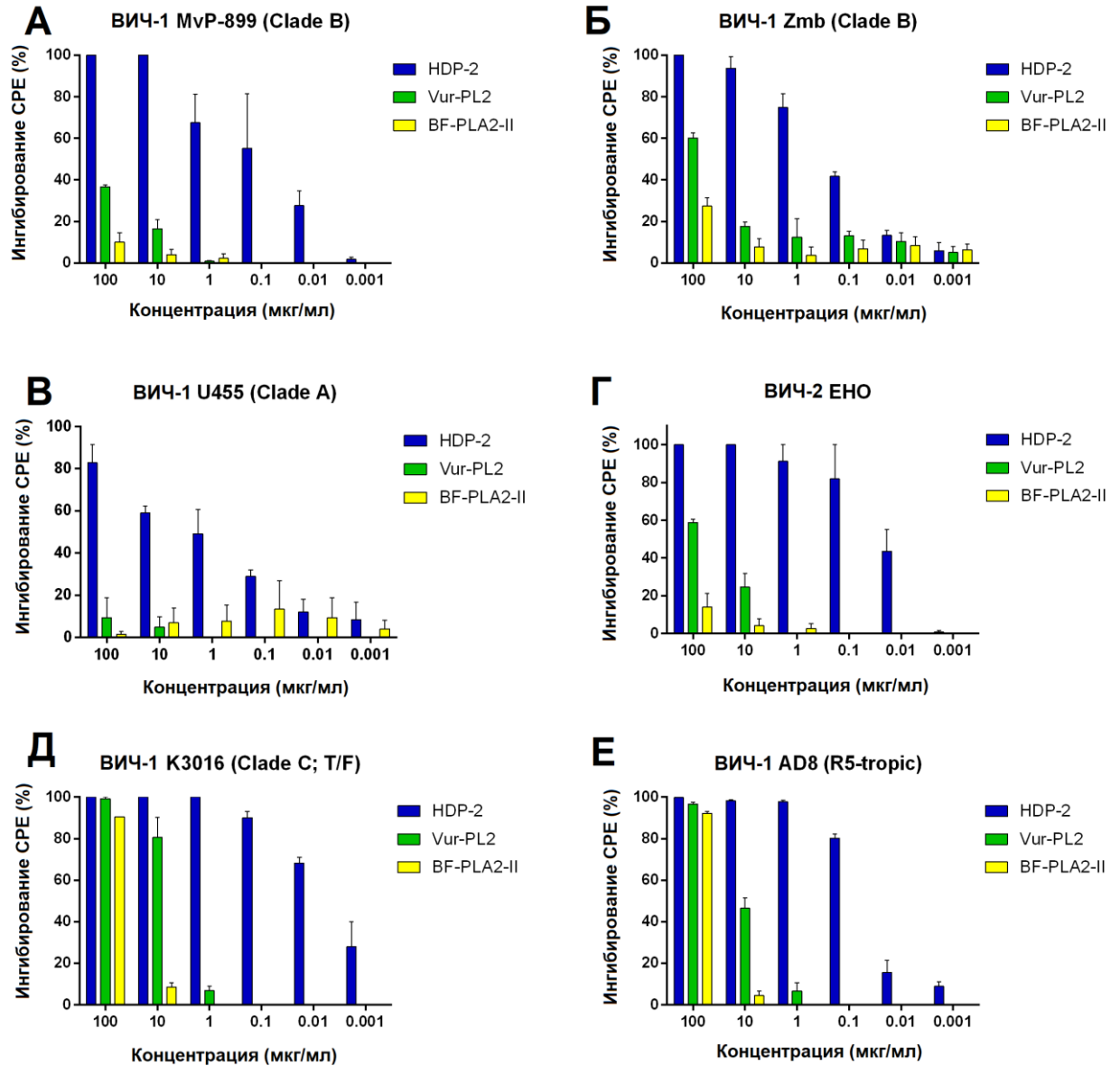




**Рисунок 37.** Противовирусная активность исследуемых ФЛА2 против псевдовирусов ВИЧ-1. ФЛА2 в различных концентрациях добавляли к клеткам-мишеням TZM-bl и трансдуцировали псевдотипированными вирионами ВИЧ-1, представляющими А) субтип А6 или Б) уникальную рекомбинантную форму CRF02\_AG/A6. Инфекционность оценивалась по активности репортерного гена  $\beta$ -Gal через 48 ч после инфицирования. Данные представляют собой среднее  $\pm$  SEM.

Противовирусная активность димерной ФЛА2 HDP-2, так же как и двух мономерных Vur-PL2 и BF-PLA2-II, была протестирована с использованием панели лабораторных высокопатогенных штаммов ВИЧ-1 с различными субтипами, варианта ВИЧ-2 ЕНО и инфекционных молекулярных клонов (K3016 и AD8). Было обнаружено, что ФЛА2 HDP-2 активно ингибирует все варианты ВИЧ (Рис. 38, Табл. 2). Мономерная ФЛА2 Vur-PL2 показала невысокую активность против штаммов ВИЧ-1 MvP-899, ВИЧ-1 Zmb и ВИЧ-2 ЕНО при максимальной концентрации, используемой в экспериментах (100

мкг/мл) (Рис. 38А, Б и Г). Тем не менее, как Vur-PL2, так и BF-PLA2-II, были способны практически полностью ингибировать репликацию инфекционных молекулярных клонов К3016 и AD8 (Рис. 38Д, Е).



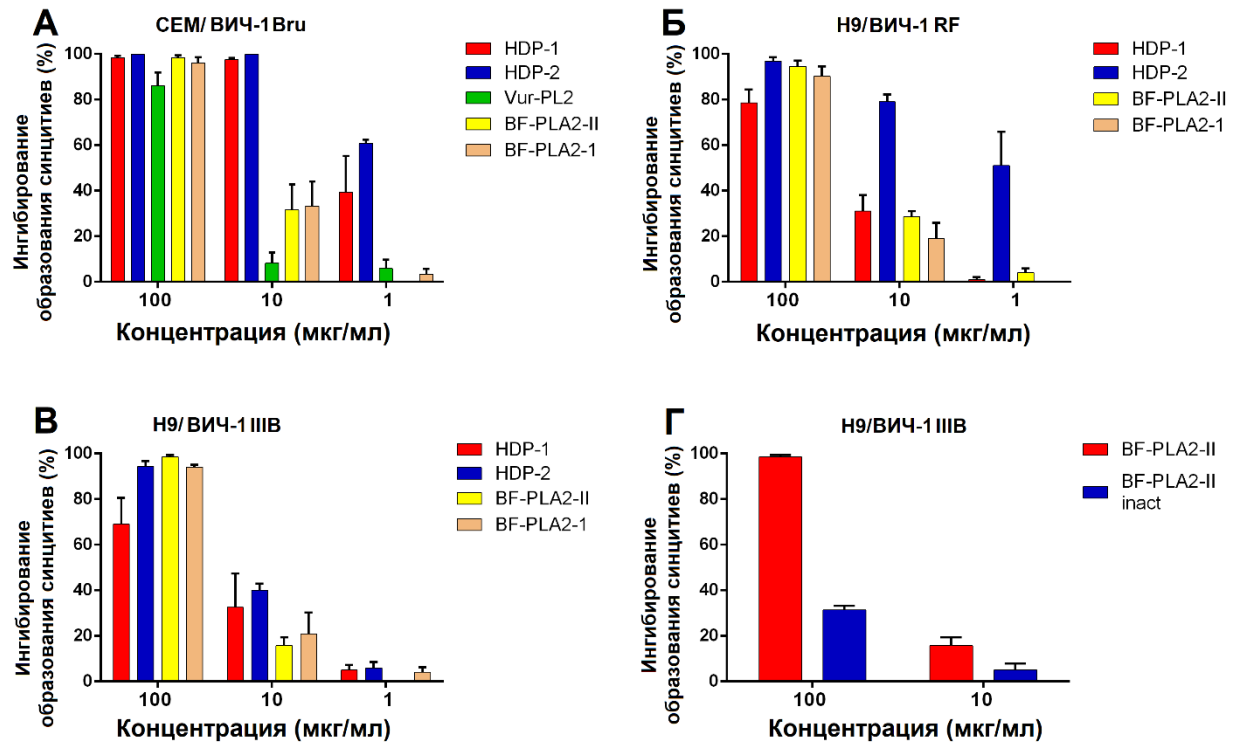
**Рисунок 38.** Противовирусная активность различных ФЛА2 в отношении лабораторных штаммов ВИЧ и инфекционных молекулярных клонов. А-Г) К клеткам МТ-4 добавляли разведения ФЛА2, после чего производили заражение клеток соответствующим штаммом ВИЧ при 100ТСID<sub>50</sub>. Ингибирование СРЕ определяли через 48-72 ч инфекции с помощью МТТ метода. Д-Е) Ингибирование репликации инфекционных молекулярных клонов с использованием ФЛА2 определяли на клетках TZM-bl через 48 ч инфекции по активности репортерного гена β-Gal. Данные представляют собой среднее ± SEM.

**Таблица 2.** Значения 50% ингибирующей концентрации (IC<sub>50</sub>) для исследуемых ФЛА2 против ВИЧ.

Вирус-клеточная система	IC <sub>50</sub> (мкг/мл)		
	HDP-2	Vur-PL2	BF-PLA2-II
MT-4/ВИЧ-1 MvP-899	0.1	-	-
MT-4/ВИЧ-1 Zmb	0.22	16.45	-
MT-4/ВИЧ-1 U455	0.9	-	-
MT-4/ВИЧ-2 EHO	0.016	10.41	-
TZM-bl/ВИЧ-1 K3016	0.009	4.37	12.21
TZM-bl/ВИЧ-1 AD8	0.046	10.29	14.26

### ***3.5.2 Влияние ФЛА2 на образование синцитиев в системе сокультивации хронически-инфицированных ВИЧ-1 клеток и индикаторных клеток Sup-T1***

Хронически ВИЧ-1 инфицированные клетки H9/ВИЧ-1<sub>ШВ</sub>, H9/ВИЧ-1<sub>RF</sub> и SEM/ВИЧ-1<sub>Вгн</sub> использовались в качестве клеток-индукторов для образования синцитиев, которые были получены спустя  $\geq 50$  дней после инфицирования ВИЧ-1. 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, дозозависимо ингибируя образование синцитиев в клетках, которые хронически инфицированы различными штаммами ВИЧ-1. Мономерная Vur-PL2 показала активность в блокировании образования синцитиев с использованием клеток SEM/ВИЧ-1<sub>Вгн</sub> (Рис. 39А). 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. 39А-В). Однако, ингибирование ферментативной активности BF-PLA2-II (inact) привело к снижению ингибирования образования синцитиев с использованием клеток H9/ВИЧ-1<sub>ШВ</sub> (Рис. 39Г).



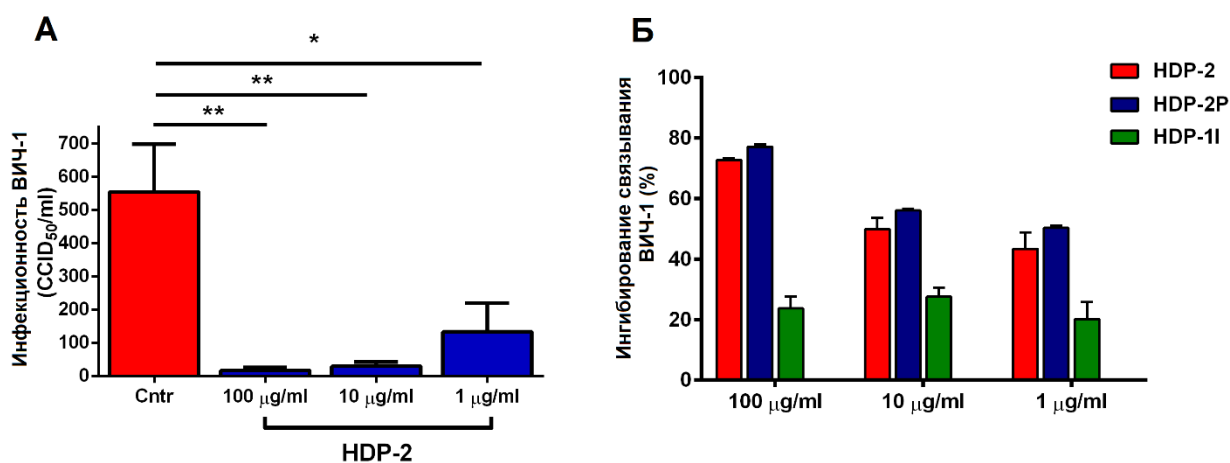
**Рисунок 39.** Влияние ФЛА2 на образование синцитиев. Клетки Sup-T1 и клетки, хронически инфицированные ВИЧ-1, смешивали и обрабатывали в присутствии ФЛА2 или PBS (контроль). Уровень слияния клеток оценивали через 24 ч под микроскопом. Показано ингибирование образования синцитиев с помощью ФЛА2 для систем, с использованием клеток А) СЕМ/ВИЧ-1<sub>Bru</sub>, Б) Н9/ВИЧ-1<sub>RF</sub>, В) Н9/ВИЧ-1<sub>IIIВ</sub> и Г) Н9/ВИЧ-1<sub>IIIВ</sub> с ферментативно активной и неактивной BF-PLA2-II. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM трех независимых экспериментов.

### 3.5.3 Вирулицидная активность димерной ФЛА2 HDP-2 и блокирование адсорбции ВИЧ-1

Прямая вирулицидная активность димерной HDP-2 была оценена против инфекционности ВИЧ-1. Вирус инкубировали с различными концентрациями HDP-2 или ростовой среды (в качестве контроля) при 37°C в течение 1 ч, а затем разбавляли ниже IC<sub>50</sub> и инокулировали в клетки MT-4 методом предельных разведений. Результаты показали, что HDP-2 эффективно дозозависимо нейтрализует инфекционность ВИЧ-1 (Рис. 40А). 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. Клетки MT-4

инфицировали ВИЧ-1 в течение двух часов в присутствии различных разведений ФЛА2 или PBS (буфер; в качестве контроля), после чего определяли внутриклеточную концентрацию ВИЧ-1 антигена p24 с помощью ИФА. 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. 40Б).

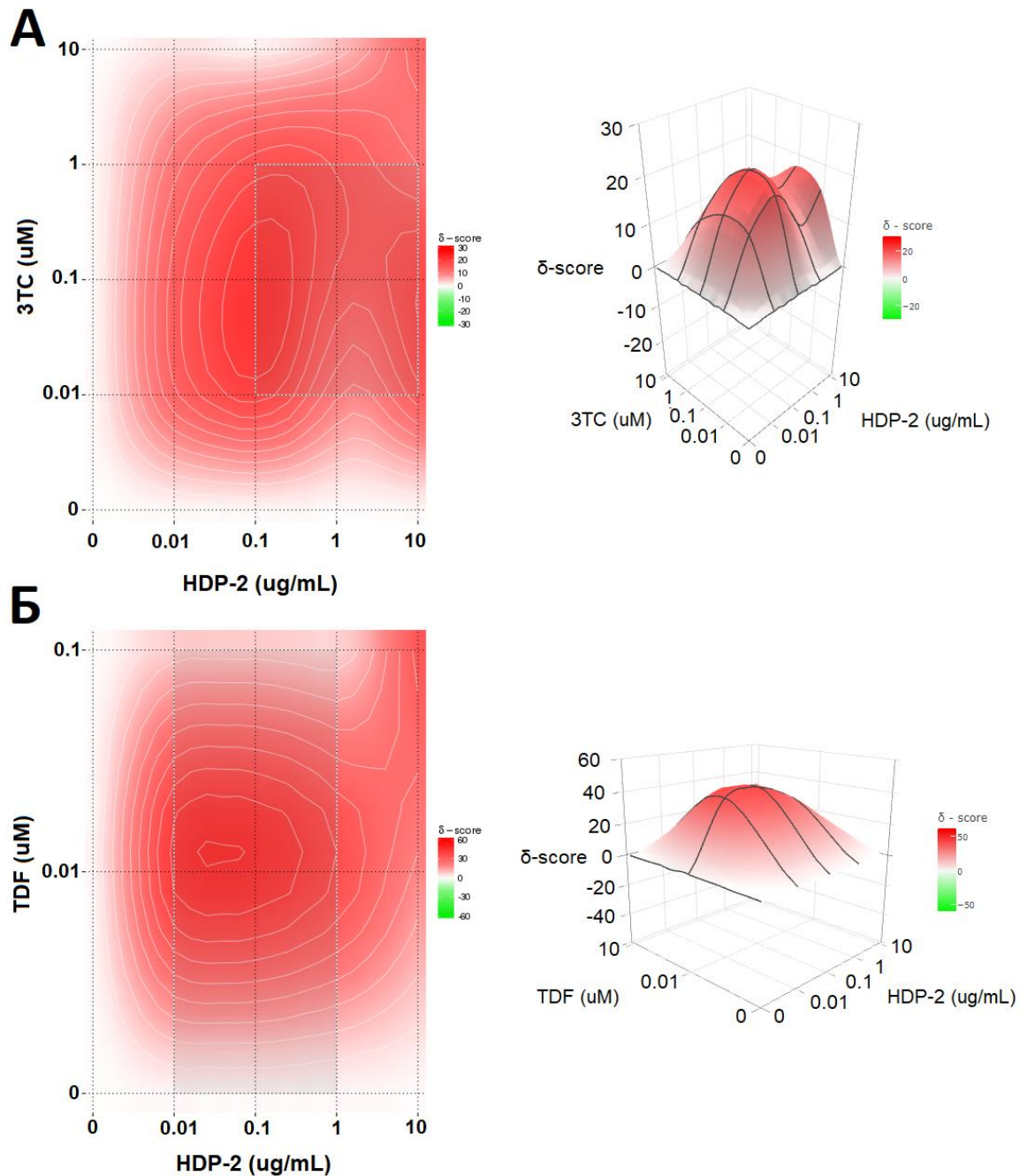


**Рисунок 40.** Механизмы противовирусной активности димерной ФЛА2 HDP-2. А) Сток ВИЧ-1 обрабатывали различными концентрациями HDP-2, а затем использовали для заражения клеток МТ-4 в течение 5 дней. Противовирусный эффект HDP-2 оценивали путем определения титра вируса на основе СРЕ. Данные представляют собой среднее  $\pm$  SEM для трех независимых экспериментов. ANOVA тест с Turkey post hoc тестом: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . Б) Ингибирующее действие HDP-2 и ее субъединиц на связывание ВИЧ-1<sub>ПВ</sub> с клетками МТ-4. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ).

### 3.5.4 Синергидные эффекты HDP-2 и нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ (НИОТ)

В ходе работы были проведены исследования по оценке ингибирования ВИЧ-инфекции комбинациями ФЛА2 HDP-2 с Ламивудином (ЗТС) или Тенофовиром (TDF). К клеткам МТ-4 добавляли различные концентрации соединений по отдельности или в комбинациях, после чего производили заражение ВИЧ-1 ПВ. ВИЧ-индуцированный СРЕ измеряли через 48 ч, для последующего определения синергизма комбинаций соединений. Полученные

данные показали, что комбинации HDP-2/ЗТС и HDP-2/TDF подавляли ВИЧ-опосредованный СРЕ с баллами синергии 12,9 и 24,5, соответственно (Рис. 41). Таким образом, две исследуемые комбинации лекарственных средств с ФЛА2, продемонстрировали выраженный синергизм с более высоким показателем синергии для комбинации HDP-2/TDF.



**Рисунок 41.** Комбинации HDP-2 с А) ЗТС или Б) TDF ингибируют ВИЧ-опосредованный СРЕ в клетках МТ-4. Ландшафты взаимодействия лекарственных препаратов и HDP-2, полученные концентрационно-матриксным методом. Показаны синергидные распределения и трехмерные синергидные ландшафты.

## 4 Обсуждение

Блуждающий нерв (черепной нерв X) - самый длинный из черепных нервов и его основная функция заключается в регулировании парасимпатической нервной системы. Ранее было показано, что стимуляция блуждающего нерва может уменьшить воспаление как в периферических лимфоидных органах, так и в головном мозге [209,210]. Сложные взаимодействия между нервной и иммунной системами, опосредующие этот «противовоспалительный рефлекс», до сих пор полностью не изучены [211]. Однако установлено, что противовоспалительные эффекты, наблюдаемые после стимуляции блуждающего нерва, опосредуются активацией  $\alpha 7$  nAChR, которые обнаруживаются на клетках врожденной иммунной системы [8].

Первый раздел данной работы посвящен изучению функциональной экспрессии и роли  $\alpha 7$ -рецепторов в макрофагах человека в контексте патогенеза сепсиса и иммуносупрессии. Нами было установлено, что макрофаги (ТНР-1Мф), полученные из клеток ТНР-1, экспрессируют функциональные  $\alpha 7$  nAChR. В ряде исследований было обнаружено, что моноциты [62], дендритные клетки [212], НК-клетки [55], Т- и В-лимфоциты [37,39] экспрессируют различные типы nAChR. В ходе данного исследования не удалось обнаружить значительных изменений в повышении концентрации внутриклеточного кальция в ТНР-1Мф во время применения никотина, неселективного агониста nAChR. Однако, использование PNU 120596, положительного аллостерического модулятора  $\alpha 7$  nAChR, при совместном применении с никотином привело к увеличению содержания кальция. Селективный агонист  $\alpha 7$  nAChR - PNU 282987 - индуцировал аналогичное повышение уровня концентрации кальция, как и эпibatидин. PNU 282987 совместно с PNU 120596 вызывали устойчивый рост внутриклеточной концентрации кальция.  $\alpha$ -bgt и MLA почти полностью блокировали наблюдаемое повышение кальция в никотин-чувствительных клетках или клетках, чувствительных к PNU 282987. Подобный тип ответа был

зарегистрирован в других клетках человека, таких как НК-клетки [55], эндотелиальные клетки [213] и лимфоциты периферической крови [214]. В предыдущих исследованиях с использованием альвеолярных макрофагов [215], моноцитарных клеток U937 [116] и клеток мышинной микроглии [75] не удалось детектировать токи в ответ на такие агонисты, как никотин или ацетилхолин. С использованием электрофизиологии, при аппликации PNU 282987 или PNU 282987 в присутствии положительного аллостерического модулятора (PNU 120596), нам удалось подтвердить, что  $\alpha 7$  nAХР в ТНР-1Мф функционирует как ионный канал (Рис. 12). Сходные результаты были описаны ранее с использованием первичных человеческих макрофагов (MDM), при совместном применении ацетилхолина с PNU 120596 [216]. Эксперименты с использованием метода ОТ-ПЦР на клетках ТНР-1Мф и MDM позволили обнаружить экспрессию мРНК субъединиц  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 7$ ,  $\beta 3$  и  $\beta 4$ , но не субъединиц  $\alpha 3$ ,  $\alpha 9$  и  $\beta 2$  (Рис. 9). Ранее было продемонстрировано [217], что макрофаги ТНР-1 окрашиваются флуоресцентным производным  $\alpha$ -bgt. В данной работе экспрессия  $\alpha 7$  nAХР на мембране ТНР-1Мф и MDM была подтверждена цитохимическим окрашиванием флуоресцентно-меченным  $\alpha$ -bgt (AF647- $\alpha$ -bgt) (Рис. 10). Наибольшее связывание AF647- $\alpha$ -bgt с  $\alpha 7$ -рецептором наблюдалось на клетках ТНР-1Мф.

Мембранный белок CD14 вместе с TLR4 и адапторными молекулами MD2, служит рецептором для таких компонентов грамотрицательных бактерий, как LPS [218]. Связывание LPS с CD14 приводит к активации иммунных клеток и избыточной продукции TNF- $\alpha$ , играющего критическую роль при сепсисе [219]. Системное ингибирование CD14 уменьшает воспаление при сепсисе [220]. Мы обнаружили, что PNU 282987 ингибирует экспрессию CD14 (Рис. 13 и 14). Схожие результаты были получены в экспериментах как с использованием ТНР-1Мф, так и MDMs. На ранней стадии сепсиса макрофаги подвергаются дифференцировке по классическому типу (M1), выделяя избыточное количество провоспалительных цитокинов



[221]. Важно отметить, что мы также наблюдали снижение экспрессии CD14 на LPS-активированных макрофагах THP-1M1. Специфичность ингибирования CD14 на MDM через  $\alpha 7$ -рецепторы была подтверждена предварительной обработкой клеток антагонистом  $\alpha 7$  nAHP -  $\alpha$ -bgt. Этот нейротоксин отменял эффекты PNU 282987, возвращая экспрессию CD14 к исходному уровню.

Снижение экспрессии HLA-DR на моноцитах и макрофагах крови происходит при остром воспалении, особенно при сепсисе [222], и может способствовать развитию вторичных инфекций. Кроме того, уровни HLA-DR обратно коррелируют с тяжестью сепсиса и иммунной дисфункцией [223]. Полученные результаты в ходе выполнения данной работы показали, что PNU 282987 приводит к увеличению экспрессии макрофагального HLA-DR, по сравнению с необработанными клетками (Рис. 13 и 14). Антагонист  $\alpha$ -bgt отменял действие PNU 282987 на MDM, подтверждая  $\alpha 7$  nAHP-опосредованный путь регуляции экспрессии HLA-DR. Кроме того, PNU 282987 увеличивал количество и уровни флуоресценции HLA-DR-позитивных клеток в LPS активированных макрофагах THP-1, указывая на то, что активация  $\alpha 7$  nAHP эффективна в процессе дифференцировки и созревания макрофагов, а также при их стимуляции с помощью LPS.

Молекулы клеточной адгезии, как известно, опосредуют межклеточные взаимодействия, особенно между Т-клетками и антигенпрезентирующими клетками. Ранее сообщалось [224], что CD54 (молекула межклеточной адгезии 1, ICAM-1) выполняет роль костимулирующего лиганда, который связывается с антигеном-1 (антиген 1, связанный с функцией лимфоцитов, LFA-1), становясь важной молекулой для активации различных популяций Т-клеток и облегчая презентацию антигена. Мы обнаружили, что стимуляция  $\alpha 7$ -рецепторов на THP-1Mф с помощью PNU 282987 приводит к повышенной экспрессии молекул клеточной адгезии CD54 (Рис.13). Система комплемента является важным компонентом как врожденного, так и приобретенного

иммунитета, которая необходима для распознавания и устранения патогенных агентов. В настоящей работе обнаружено (Рис. 14), что стимуляция  $\alpha 7$  nAHP также приводит к повышенной экспрессии рецептора CD11b, который является компонентом CR3 (рецептор комплемента 3). Таким образом, посредством активации  $\alpha 7$  nAHP становится возможным регулировать ряд мембранных макрофагальных маркеров, участвующих во взаимодействии с Т-клетками и презентации антигена.

Другая часть данной работы по изучению биологической роли  $\alpha 7$ -рецепторов была посвящена исследованию продукции цитокинов в LPS-стимулированных макрофагах. Среди них IL-10 - плеiotропный цитокин, обладающий как противовоспалительными, так и иммунодепрессивными свойствами [225]. Помимо фазы «цитокинового шторма», которая характеризуется выработкой большого количества провоспалительных цитокинов, патогенез сепсиса характеризуется фазой иммунной дисфункции. Существует достаточно доказательств того, что IL-10 является одним из основных цитокинов, участвующих в иммунной дисфункции при сепсисе [226–229]. Было показано, что моноциты, стимулированные LPS, производят высокие уровни провоспалительных цитокинов IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , GM-CSF и G-CSF, которые могут быть обнаружены в течение 4-8 ч [230]. Продукция IL-10, который оказывает сильное противовоспалительное действие на моноциты и Th1 лимфоциты, достигает пика через 24–48 ч после стимуляции. Высвобождение IL-10 важно для подавления воспалительной реакции. Однако моноциты, которые были повторно стимулированы LPS, производят низкие уровни провоспалительных цитокинов, в то время как высвобождение противовоспалительных медиаторов, таких как IL-10, увеличивается. Эта «десенсибилизация LPS», которая опосредуется IL-10, является еще одним контррегуляторным механизмом, предназначенным для контроля воспалительной реакции [231]. Было высказано предположение, что дезактивация моноцитов, происходящая во время сепсиса, вызывается IL-10

[230]. IL-10 подавляет высвобождение провоспалительных цитокинов, подавляет презентацию антигена и образование свободных радикалов кислорода [232]. В исследовании с участием 32 пациентов, перенесших обширную абдоминальную операцию, экспрессия гена IL-10 обратно коррелировала с экспрессией моноцитарного HLA-DR, что согласуется с ролью IL-10 как медиатора иммуносупрессии [233]. Его активация (повышающая регуляция) может привести к иммунной толерантности при сепсисе, что проявляется в снижении способности защищать организм от вторичных инфекций [234]. При септическом шоке наблюдается увеличение высвобождения IL-10, что коррелирует с повышенной смертностью и вторичными инфекциями [235]. Кроме того, IL-10 участвует в подавлении HLA-DR и различных костимулирующих рецепторов [236]. Мы обнаружили, что PNU 282987 дозозависимо ингибирует продукцию IL-10 в LPS-активированных макрофагах, что указывает на важную роль  $\alpha 7$ -рецепторов в снижении иммуносупрессивного состояния.

Стимуляция  $\alpha 7$  nAChR может быть достигнута с помощью агонистов или положительных аллостерических модуляторов, причем оба типа лигандов являются потенциальными терапевтическими средствами [21,237]. Обычно терапевтические стратегии лечения сепсиса направлены на подавление ранней фазы гипервоспалительного ответа [238]. Однако, состояние иммуносупрессии существует одновременно со стойким воспалением и способствует развитию рецидивирующих, вторичных и внутрибольничных инфекций, что приводит к ухудшению течения заболевания и повышению смертности [239]. Хотя поиск терапевтических средств уже давно сосредоточен на противовоспалительных стратегиях, возросшее понимание важности вызванного сепсисом истощения иммунитета в заболеваемости и смертности у пациентов с сепсисом, привело к сдвигу парадигмы в исследованиях сепсиса в сторону стратегий усиления иммунного ответа [240].

Таким образом,  $\alpha 7$  nAHP может быть важной лекарственной мишенью не только для подавления гиперовоспаления, но и для иммунной модуляции.

«Холинергический противовоспалительный путь» (САР), первоначально обнаруженный Voronikova и соавт. [7], вызывает большой интерес у научного сообщества. Согласно этой точке зрения, активация САР через  $\alpha 7$ -рецептор приводит к снижению воспалительной реакции и последующему ингибированию высвобождения цитокинов [8]. Однако, позже был обнаружен еще один противовоспалительный путь с участием nAHP и P2X7 рецепторов [115]. Было показано, что обработка LPS-стимулированных макрофагов с помощью классических лигандов nAHP, полностью блокирует P2X7-опосредованное высвобождение IL-1 $\beta$ . Пуринергическая регуляция иммунных реакций в значительной степени опосредуется рецепторами P2X7, которые участвуют в провоспалительных ответах за счет активации инфламмосомы и продукции IL-1 $\beta$  [241,242]. Активация рецепторов P2X7 и связанный с ними отток K<sup>+</sup> является ключевым событием в активации инфламмосом [117]. Остается неизвестным, на какой стадии холинергические агенты обеспечивают противовоспалительный эффект в клетках. Механизмы действия могут включать как лиганд-рецепторное взаимодействие между nAHP/P2X7, так и активацию/ингибирование внутриклеточных факторов. В ходе данной работы была впервые исследована возможная ингибирующая роль холинергических агонистов, таких как ацетилхолин и никотин, на АТФ-индуцированное открытие большой поры рецептора P2X7 в тучных клетках и макрофагах человека. Как пуринергическая, так и холинергическая передача сигналов в настоящее время признаны важными компонентами воспалительных процессов. Однако, накопленные данные свидетельствуют о том, что они играют противоположную роль: пуринергические каскады способствуют, тогда как холинергический путь ингибирует индукцию воспаления. В текущем исследовании, используя тучные клетки и макрофаги человека в качестве модельных иммунных клеток, мы выяснили, пересекаются

ли эти рецепторные пути на начальных этапах воспалительной активации. Было определено, что АТФ в обоих типах клеток открывает большие поры рецепторов P2X7, которые обычно связаны с активацией инфламмасом, и этот эффект блокируется специфическим антагонистом P2X7. Наши результаты показали отсутствие прямого ингибирующего действия холинергических агентов на ранних этапах АТФ-опосредованной активации P2X7 рецепторов, ведущей к образованию больших пор. Этот результат был продемонстрирован как на тучных клетках, так и на макрофагах. Кроме того, был обнаружен небольшой, но значимый эффект как ацетилхолина, так и никотина на поглощение YO-PRO-1 тучными клетками, который не наблюдался в макрофагах. Одна из причин такого явления заключается в том, что этот специфический эффект ацетилхолина может быть связан с массивной дегрануляцией тучных клеток, экспрессирующих мускариновые рецепторы [243], и высвобождением эндогенного АТФ [244]. Однако, тестирование действия ацетилхолина и никотина в присутствии специфического антагониста рецептора P2X7 не выявило активности этих холинергических агентов по АТФ-зависимому механизму. Никотин не дегранулирует тучные клетки [243], хотя данные свидетельствуют об экспрессии никотиновых рецепторов в этих клетках [38,245]. Более того, действие никотина может быть связано с его известным действием на рецепторы TRPA1 (катионный канал с временным рецепторным потенциалом) [246], экспрессируемые в тучных клетках [247]. Также нельзя исключать неканоническую модуляцию холинергическими лигандами в иммунных клетках. Полученные данные могут в дальнейшем помочь в поиске новых мишеней для борьбы с чрезмерными воспалительными реакциями при различных иммунных и неврологических расстройствах.

Второй раздел данной работы был посвящен исследованию цитотоксической, антипролиферативной и антивирусной активности змеиных ФЛА2. Змеиный яд содержит большое количество токсинов, обладающих

фосфолипазной активностью. Несмотря на общую консервативную структуру, ФЛА2 змей проявляют множество фармакологических активностей, которые являются результатом действия на различные клеточные мишени посредством различных молекулярных механизмов. Кроме того ранее было показано, что змеиные ФЛА2 способны связываться с НАХР [134].

Противоопухолевый эффект змеиного яда хорошо известен. Его цитотоксичность была продемонстрирована на нескольких клеточных линиях, включая HL-60 (промиелоцитарный лейкоз человека), HepG2 (гепатома человека), PC12 (феохромоцитома надпочечников), V16F10 (меланома), Jurkat (острый Т-клеточный лейкоз), SKBR-3 (рак груди), MCF-7 (рак груди), A549 (рак легких человека) и других. Несколько белков, обладающих антипролиферативной активностью, были выделены из ядов змей [248]. Таким образом было показано, что дезинтегрины, оксидазы L-аминокислот, металлопротеиназы и ФЛА2 обладают цитотоксичностью по отношению к раковым клеткам. Эти токсины продемонстрировали разную цитотоксичность в зависимости от природы клеточных линий, будучи более токсичными для определенных раковых клеток.

Рак легких и молочной железы человека являются одними из самых опасных видов рака и существует большая потребность в разработке новых эффективных лекарств для борьбы с этими заболеваниями. В ходе данной работы было проведено изучение действия цельного яда *B. fasciatus* на клетки рака груди человека MCF-7 и клетки рака легких A549, в результате чего наблюдались цитотоксические эффекты в отношении обеих клеточных линий. Выделение основного компонента яда, обладающего цитотоксическим действием, проводилось с помощью жидкостной хроматографии. В результате гель-фильтрации с последующей обращенно-фазовой хроматографией был выделен белок, который проявлял зависящую от времени цитотоксичность для клеток MCF-7 и A549, но не влиял на нормальные клетки НК2. С помощью масс-спектрометрии высокого разрешения мы показали, что аминокислотная

последовательность выделенного белка совпадала с последовательностью ФЛА2, ранее идентифицированной в яде *B. fasiatus*. После 72 ч инкубации при концентрации 100 мкг/мл (7,63  $\mu$ M), количество выживших клеток MCF-7 и A549 уменьшилось примерно на 50% (Рис. 22). Морфологические изменения в данных клетках, обработанных разными концентрациями сырого яда, наблюдали с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа. После обработки ядом или его фракциями, клетки откреплялись от культурального пластика; форма клеток стала округлой, а межклеточные пространства увеличились (Рис. 26). Эти явления наблюдались и при внесении выделенной ФЛА2 (фракция BF3.3). Молекулярный механизм действия ФЛА2 был изучен более подробно с помощью проточной цитометрии. Внутриклеточный маркер Ki-67 является одним из важнейших индикаторов пролиферации клеток [249]. Наши исследования показали, что обработка клеток MCF-7 с помощью ФЛА2 приводила к снижению экспрессии Ki-67 (Рис. 27). Эти данные свидетельствуют об антипролиферативном эффекте изученной ФЛА2. Исследования с помощью проточной цитометрии позволяют точно различать пути апоптотической и некротической гибели клеток. Используя этот метод, было выяснено, что обработка клеток MCF-7 с помощью ФЛА2 (Рис. 28) приводила к увеличению числа апоптотических клеток, таким образом предполагая апоптотический путь гибели.

Следует отметить, что ранее сообщалось о цитотоксической активности некоторых ФЛА2 из ядов змей [250]. Наблюдаемая активность сильно зависела от природы ФЛА2 и линии клеток, использованной для исследования. Однако, значения  $IC_{50}$ , в основном, находятся в диапазоне примерно от 40 до 200 мкг/мл. Цитотоксичность ФЛА2, исследованной в данной работе, находилась в том же диапазоне. Наиболее широко исследована цитотоксичность фосфолипаз, выделенных из ядов гадюкообразных змей (*Viperidae*). Данных о цитотоксичности по отношению к раковым клеткам фосфолипаз аспидовых змей (*Elapidae*) не так много. Есть только два примера

- нигексин из кобры *Naja nigricollis* [251] и ФЛА2 из змеи *Lapemis hardwickii* [252]. Оба этих фермента были несколько активнее нашего, со значениями  $IC_{50}$  в диапазоне от 39 до 69 мкг/мл. Однако, эти значения были определены на клеточных линиях, отличных от используемых в данной работе.

В ходе данной работы мы протестировали действие выделенной ФЛА2 на доброкачественные клетки и обнаружили, что эти клетки не были подвергнуты какому-либо эффекту. Это вряд ли было бы возможно, если бы цитотоксичность была результатом ферментативной активности. Более того, ранее было показано [253], что химическая модификация р-бромфенацилбромидом отменяет ферментативную активность ФЛА2 из *Macrovipera lebetina transmediterranea* (подвид гадюк), не влияя на ее противоопухолевый эффект. Эти факты означают, что цитотоксичность не связана напрямую с ферментативной активностью. Фармакологический сайт, ответственный за цитотоксическую активность, был локализован в С-концевой области молекулы ФЛА2 [254]. Аминокислотные последовательности С-концевых фрагментов ФЛА2 из аспидовых змей сильно отличаются от таковых у гадюк. Однако, цитотоксическая активность ФЛА2 данных видов змей очень похожа. Более того, С-концевые аминокислотные последовательности довольно сильно различаются между ФЛА2 кобры и крайта. Это означает, что С-концевой фрагмент может быть не так важен для цитотоксичности в исследуемой ФЛА2.

Следует отметить, что цитотоксичность в отношении клеток MCF-7 и A549 проявлялась также несколькими белками змеиного яда, отличными от ФЛА2. Цитотоксины ядов кобры [255,256], рувипраза гадюки Рассела [257] и оксидазы L-аминокислот [258,259] ингибируют пролиферацию клеток MCF-7 с разной эффективностью. Наибольшую активность продемонстрировала оксидаза L-аминокислот из яда королевской кобры со значением  $IC_{50}$  0,04 мкг/мл для клеток MCF-7 после 72 ч обработки [258]. Более разнообразный набор белков змеиного яда проявил цитотоксическую активность против



клеток A549. Это были сериновые протеазы [260], низкомолекулярный лектин С-типа дабиалектин [261], токсин C13S1C1 и токсин F-VIII из семейства трехпетельных токсинов [262], а также оксидазы L-аминокислот [263]. Наиболее активной оказалась оксидаза L-аминокислот из яда королевской кобры, которая ингибировала рост клеток со значением  $IC_{50}$  0,05 мкг/мл для клеток A549 после 72 ч обработки [258].

Принимая во внимание активность белков яда змей, о которых говорилось выше, следует учитывать не только цитотоксичность для раковых клеток, но и их другие биологические эффекты и структурные особенности. Например, оксидаза L-аминокислот представляет собой очень большой белок и вряд ли может быть использована в качестве лекарства, цитотоксины из яда кобры обладают очень высокой токсичностью *in vivo*, в то время как дезинтегрины и лектиноподобные белки С-типа влияют на функции тромбоцитов. Все эти белки можно рассматривать как основу для разработки новых лекарств. Пептиды, соответствующие определенным аминокислотным последовательностям ФЛА2 и обладающие цитотоксичностью для раковых клеток, могут быть использованы как основа для терапевтических агентов.

Литературные данные показывают, что ФЛА2, выделенные из различных источников, обладают противовирусной активностью против ряда вирусов, включая вирусы денге и желтой лихорадки [196], ВИЧ [264], вирус саркомы Рауса [265], аденовирус [266] и вирус Ньюкасла [267]. Текущие усилия по борьбе с пандемией COVID-19 в первую очередь сосредоточены на гигиене, карантине инфицированных людей, соблюдении социальной дистанции, а также на разработке и использовании вакцин [268,269]. Тем не менее, несмотря на значительный успех, миллионы людей все еще инфицированы, и как на данный момент, так и в будущем (из-за высокой скорости мутаций в вирусном геноме) пациенты нуждаются в эффективных терапевтических средствах. В ходе данного исследования было определено, что многообещающей отправной точкой для нового противовирусного агента

против возбудителя COVID-19 являются змеиные ФЛА2, поскольку некоторые из них обладают высокой противовирусной активностью против SARS-CoV-2 и низкой цитотоксичностью. Наиболее мощным антивирусным действием в текущем исследовании обладала димерная фосфолипаза HDP-2, выделенная из *Vipera nikolskii*, механизмы действия которой против SARS-CoV-2 были подробно изучены в данной работе.

Наши данные показали, что ферментативная активность фосфолипазы HDP-2 вносит существенный вклад в противовирусный эффект. Впервые, с использованием трансмиссионной электронной микроскопии, было обнаружено, что обработка SARS-CoV-2 и BCV с помощью HDP-2 вызывает не только изменение морфологии вирионов, но и значительное разрушение вирусной мембраны (Рис. 32). Эти данные позволяют предположить, что HDP-2 расщепляет липиды вирусной мембраны. Такие результаты согласуются с предыдущими исследованиями, которые показали, что кротоксин (димерная ФЛА2), выделенный из яда *Crotalus durissus terrificus*, и его ферментативно активная субъединица PLA2-СВ инактивируют вирус денге типа 2 (*Flaviviridae*), вирус Росио (*Flaviviridae*), вирус Оропуш (*Peribunyaviridae*) и вирус Майаро (*Togaviridae*) путем расщепления глицерофосфолипидов оболочки, которые происходят из мембран клеток-хозяев [196,270]. Кроме того, несколько исследований подтверждают идею о том, что ФЛА2, принадлежащие к группам V и X, ингибируют аденовирусную инфекцию путем гидролиза плазматической мембраны клеток-хозяев [266]. Напротив, кротоксин и PLA2-СВ были неактивны против безоболочечного вируса Коксаки В5 и вируса энцефаломиокардита (*Picornaviridae*) или вирусов, отпочковывающиеся через плазматическую мембрану [198]. Однако не все оболочечные вирусы чувствительны к действию ФЛА2, и это, вероятно, связано с тем, что состав фосфолипидов в мембране эндоплазматического ретикула отличается от таковых в плазматической мембране, что приводит к разному составу фосфолипидов в оболочках разных вирусов [271–273].

Таким образом, в зависимости от происхождения и, следовательно, состава оболочки, ФЛА2 могут по-разному влиять на вирусы и проявлять различную вирулицидную активность.

Продукты гидролиза липидов, вызываемого ФЛА2, также могут играть важную роль в биологической активности; например, лизофосфатидилхолин, образующийся при ФЛА2-опосредованном гидролизе фосфатидилхолина, как было ранее показано, ингибирует слияние мембран, вызванное вирусом гриппа (*Orthomyxoviridae*), обезьяньим иммунодефицитом (*Retroviridae*), вирусом Сендай (*Paramyxoviridae*) и вирусом бешенства (*Rhabdoviridae*), блокируя проникновение вируса в клетку [274–276]. Еще одним продуктом гидролиза мембранных липидов с помощью ФЛА2 является арахидоновая кислота (АК), ингибирующее действие которой на репликацию вируса было продемонстрировано для MERS-CoV [277]. Мы обнаружили, что АК ингибирует СРЕ SARS-CoV-2 при высокой концентрации. Эти данные показывают, что АК, высвобождаемая при гидролизе мембранных липидов с помощью ФЛА2, может вносить вклад в ингибирующее действие ФЛА2.

Оболочка коронавирусов содержит поверхностные гликопротеины (в частности, гликопротеин S), которые образуют «корону» и опосредуют проникновение вируса в клетки. Гликопротеин S состоит из двух доменов: S1, который связывается с рецептором ACE2 на поверхности клеток-хозяев, и S2, который опосредует слияние вирусной оболочки с клеточной мембраной. После связывания с ACE2, протеазы клеток-мишеней активируют гликопротеин S, расщепляя сайт между S1 и S2, что приводит к слиянию вирусной и клеточной оболочек и проникновению вируса [278,279]. В данном исследовании было обнаружено, что ФЛА2 HDP-1 и HDP-2 способны блокировать взаимодействие клеток с гликопротеином S SARS-CoV-2 (Рис. 33), возможно, действуя аналогично пептидным ингибиторам слияния [280]. Также возможно, что ФЛА2 могут ингибировать связывание SARS-CoV-2 с ACE2, поскольку полученные данные показывают, что HDP-2P снижает

связывание anti-ACE2 антител и белка SARS-CoV-2 RBD с клетками 293T/ACE2 (Рис. 34) и таким образом подтверждают эту гипотезу. В пользу данной гипотезы свидетельствуют результаты молекулярного моделирования, которое выявило гомологию HDP-2P с ACE2 и белком RBD SARS-CoV-2. Аналогичным образом было показано, что ряд пептидов из яда скорпиона активен против ретровирусов, таких как ВИЧ и ВИО (вирус иммунодефицита обезьян), благодаря их способности связываться с гликопротеином gp120 ВИЧ за счет молекулярной мимикрии клеточного рецептора CD4. В результате они блокируют взаимодействия gp120-CD4, которое важно для инициации конформационных изменений в вирусной оболочке, запускающих проникновение вируса в клетки [281].

Таким образом, в данной работе впервые исследована противовирусная активность ФЛА2 змей против SARS-CoV-2 и BCoV. Димерная фосфолипаза HDP-2 и ее каталитическая субъединица показали вирулицидную активность в наномолярном диапазоне. Однако, вирулицидная активность этих белков значительно снижалась при ингибировании ферментативной активности ФЛА2 (Табл. 1), что указывает на то, что данный эффект, скорее всего, связан с расщеплением фосфолипидов на оболочке вируса, что может привести к разрушению липидного бислоя и дестабилизация поверхностных гликопротеинов вируса. Кроме того, ФЛА2 могут предотвращать проникновение вируса в клетку, ингибируя его связывание с ACE2. Эти данные подчеркивают потенциал ФЛА2 как натурального продукта, который может оказаться полезным в качестве отправной точки для разработки противовирусных препаратов.

В литературе имеются данные о том, что ФЛА2 млекопитающих, а также ФЛА2, выделенные из пчелиного и змеиного яда, блокируют репликацию ВИЧ, предотвращая внутриклеточное высвобождение вирусного нуклеокапсидного белка [282]. Кроме того, для ФЛА2 человека была показана антивирусная активность против лентивирусов, которая зависела от

каталитической активности [264]. В рамках данного исследования была проанализирована активность полученных нами ФЛА2 из различных змей против ВИЧ-1. Было обнаружено, что механизмы противовирусной активности змеиных ФЛА2 аналогичны действию ФЛА2 млекопитающих, но отличаются от ранее обнаруженных механизмов ФЛА2 из яда пчел и змей против лентивирусов.

Мы обнаружили, что димерные ФЛА2 (HDP-1 и HDP-2) проявляют высокую противовирусную активность против ВИЧ-1 дикого типа и псевдовирюсов. Кроме того, димерная ФЛА2 HDP-2 показала высокую активность против ряда высокопатогенных штаммов ВИЧ-1, ВИЧ-2 и инфекционных молекулярных клонов (Табл. 2). Исследуемые ФЛА2 были способны по-разному ингибировать различные подтипы ВИЧ-1. Высокий противовирусный эффект наблюдался для суб-субтипа А6, в то время как значительное снижение противовирусной активности наблюдалось для рекомбинантной формы CRF02\_AG/А6. Такие различия могут быть связаны с плотностью гликопротеинов, расположенных на оболочке вириона, особенностями гликозилирования и различием структуры белков на вирусной мембране. Ранее сообщалось [283], что ВИЧ-1 может ускользать от ингибирующего действия ФЛА2, что обусловлено наличием специфических гликопротеинов оболочки ВИЧ-1 (наличие редких мутаций в N-концевой области и удлинение варибельной петли V1-V2), что позволяет ВИЧ инфицировать клетки альтернативным путем проникновения, основанным на переносе эндосом. Таким образом, различия в противовирусном действии исследуемых ФЛА2 на псевдовирюсах с двумя разными подтипами также могут быть связаны с плотностью гликопротеинов вириона, гликозилированием и наличием мутаций в гликопротеине ВИЧ-1.

Ранее было показано, что ФЛА2, выделенная из яда *Crotalus durissus terrificus*, обладает мощной противовирусной активностью против вирусов денге и желтой лихорадки в вирулицидном тесте, что дает убедительные

доказательства прямого действия этих токсинов на вирусную частицу [196,270]. Мы также обнаружили прямой вирулицидный эффект димерной HDP-2, выделенной из *Vipera nikolskii*, что подтверждает способность ФЛА2 змей инактивировать различные вирусы. Инактивация вирусов, скорее всего, связана с ферментативной активностью ФЛА2, которая основана на гидролизе sn-2-ацильной сложноэфирной связи и образовании жирных кислот и лизофосфолипидов [284]. Гидролиз глицерофосфолипидов может привести к деградации вирусной оболочки, что вызовет потерю инфекционности вирионов и их способности инфицировать клетки. Эти предположения были полностью нами подтверждены с использованием SARS-CoV-2 и BCV и трансмиссионной электронной микроскопии (Рис. 32).

Сообщалось, что несколько ФЛА2, включая ФЛА2 из яда змеи *Naja mossaambica mossaambica* (NmMCMIII), защищают первичные лимфоциты крови человека от репликации различных макрофаго- и Т-клеточно-тропных штаммов ВИЧ-1 [282]. Однако, ингибирование ВИЧ-1 с помощью ФЛА2 не было результатом вирулицидного действия. ФЛА2 не влияла ни на связывание вируса с клетками, ни на образование синцитий, а каталитическая активность ФЛА2 не являлась существенной для проявления противовирусного эффекта. Мы обнаружили, что ферментативная активность изученных ФЛА2 змей важна для противовирусного эффекта. Ингибирование ферментативной активности каталитической субъединицы HDP-2P, выделенной из димерной HDP-2, привело к резкому снижению активности против ВИЧ-1. Это наблюдение согласуется с предыдущим исследованием, показывающим, что человеческая ФЛА2-X обладает противовирусной активностью против лентивирусов благодаря своей каталитической функции и распознаванию вирусной оболочки [264].

Наши результаты показывают, что ингибирование ВИЧ-1 с помощью ФЛА2 происходит на начальных этапах цикла репликации вируса. ВИЧ проникает в клетку путем слияния с плазматической мембраной клеток,

посредством связывания gp120 ВИЧ с рецепторами CD4 и хемокинами CXCR4 или CCR5. Полученные данные показывают, что связывание gp120 с этими клеточными рецепторами ингибируется ФЛА2, поскольку все изученные ФЛА2 проявляли активность в ингибировании образования синцитиев в системе совместного культивирования хронически ВИЧ-1 инфицированных клеток и CD4<sup>+</sup> клеток Sup-T1 (Рис. 39). Мы обнаружили, что димерная HDP-2, а также ее ферментативно-активная субъединица HDP-2P способны ингибировать связывание ВИЧ-1 с клетками. Аналогичные данные были получены ранее для сырого яда *C. d. terrificus* и его токсинов, таких как кротоксин, ФЛА2-СВ и ФЛА2-ИС, которые ингибировали адсорбцию как вируса желтой лихорадки, так и вируса денге [196]. Интересно отметить, что ФЛА2 из пчелиного яда, не проявляют ингибирующего действия на образование синцитиев, указывая, что ФЛА2 пчел не действуют на процесс слияния вируса с клеткой [282]. Однако, синтетические пептиды, полученные из ФЛА2 пчелиного яда, были способны ингибировать репликацию ВИЧ-1 и образование синцитиев за счет взаимодействия с клеточным ко-рецептором CXCR4, что может быть связано с наличием гомологичных последовательностей в ФЛА2 и гликопротеинах вирусной оболочки [285].

Таким образом, полученные в этой работе данные показывают, что димерные ФЛА2 с высокой эффективностью ингибируют репликацию ВИЧ и SARS-CoV-2. Деструктивное действие ФЛА2 на вирусную мембрану было подтверждено с помощью вирулицидного теста. ФЛА2 могут оказывать прямое воздействие на вирусные частицы, скорее всего, за счет расщепления глицерофосфолипидов на вирусной оболочке, что приводит к разрушению липидного бислоя и дестабилизации вируса. Кроме того, ФЛА2 HDP-2 приводит к ингибированию ранних стадий цикла репликации ВИЧ-1 и SARS-CoV-2, что было подтверждено с помощью анализов ингибирования образования синцитиев и вирусной адсорбции. Таким образом, ФЛА2 змей

могут быть хорошими кандидатами для разработки новых противовирусных препаратов широкого спектра действия.



## 5 Выводы

1. Функциональная активность никотиновых холинорецепторов на первичных макрофагах человека и модельных клетках THP-1 впервые исследована с помощью комплекса методов – ПЦР, иммуноцитохимии, 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  $\alpha 7$  nAChR 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 гликопротеином S 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.

## **Благодарности**

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю, д.х.н., проф., чл.-корр. РАН Цетлину Виктору Ионовичу за постановку темы диссертации, ценные советы и идеи на всем протяжении работы.

Автор выражает благодарность д.х.н., проф. Уткину Юрию Николаевичу за предоставление охарактеризованных змеиных белков и ценные замечания по второй части диссертационной работы.

Автор выражает благодарность к.б.н. Стрельцовой Марии Алексеевне, за помощь в проведении экспериментов с использованием проточной цитометрии, анализе и интерпритации данных, а также за ценные советы.

Автор выражает благодарность д.х.н. Шелухиной Ирине Валерьевне за помощь по исследованиям экспрессии холинорецепторов, а также за ценные советы и замечания.

Автор выражает благодарность д.б.н. Кудрявцеву Денису Сергеевичу за помощь в выполнении электрофизиологических исследований.

**Приложение 1.** Последовательности праймеров для генов различных субъединиц НАХР.

<b>Ген</b>	<b>Прямой праймер</b>	<b>Обратный праймер</b>
$\alpha 1$	GGCTCCGAACATGAGACCCG	GCGTGACTTTGGGAGTTCCTTT
$\alpha 2$	TGACCCACATGACCAAGGCCCA	TGGTGAACAGCAGGTACTCGCC
$\alpha 3$	CCGAGGCCCTCTACGGT	CACACAGCTTAGTGCTTA
$\alpha 4$	CCTCGGCCTGTCCATCGCTCA	AAGACGGTGAGCGACAGCAGC
$\alpha 7$	CCCGGCAAGAGGAGTGAAAGGT	TGCAGATGATGGTGAAGACC
$\alpha 9$	AGAGCCTGTGAACACCAATGTGG	ATGACTTTCGCCACCTTCTTCC
$\beta 2$	GTGTCCTTCTATTCCAAT	AATGATGAAGTCATACGT
$\beta 3$	AAGGGGAACAGAAGGGACGG	GAAGCAGTACGTCGCGGACG
$\beta 4$	CAACAACCTGATCCGCCAGC	GAAGGGAAAGTACTTCACCTC
$\beta$ -actin	GAGCGGAAATCGTGCGTGACATT	GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG

**Список литературы**

1. Ulloa L., Tracey K.J. The “cytokine profile”: A code for sepsis // Trends Mol. Med. Elsevier Ltd, 2005. Vol. 11, № 2. P. 56–63.
2. Martin G.S. et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000 // N. Engl. J. Med. 2003. Vol. 348, № 16. P. 1546–1554.
3. Rice T.W., Bernard G.R. Therapeutic Intervention and Targets for Sepsis // Annu. Rev. Med. Annual Reviews, 2005. Vol. 56, № 1. P. 225–248.
4. Rutgeerts P., Van Assche G., Vermeire S. Review article: Infliximab therapy for inflammatory bowel disease - Seven years on // Alimentary Pharmacology and Therapeutics. 2006. Vol. 23, № 4. P. 451–463.
5. Ulloa L., Messmer D. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: Friend and foe // Cytokine and Growth Factor Reviews. 2006. Vol. 17, № 3. P. 189–201.
6. Abraham E. et al. Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock // Lancet. Lancet Publishing Group, 1998. Vol. 351, № 9107. P. 929–933.
7. Borovikova L. V. et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin // Nature. 2000.
8. Wang H. et al. Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit is an essential regulator of inflammation // Nature. 2003.
9. Sansonetti P.J. The innate signaling of dangers and the dangers of innate signaling // Nature Immunology. Nature Publishing Group, 2006. Vol. 7, № 12. P. 1237–1242.
10. Bäckhed F. et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine // Science. 2005. Vol. 307, № 5717. P. 1915–1920.
11. Matteoli G., Boeckxstaens G.E. The vagal innervation of the gut and immune

- homeostasis // *Gut*. *Gut*, 2013. Vol. 62, № 8. P. 1214–1222.
12. Luyer M.D. et al. Nutritional stimulation of cholecystokinin receptors inhibits inflammation via the vagus nerve // *J. Exp. Med.* The Rockefeller University Press, 2005. Vol. 202, № 8. P. 1023–1029.
  13. de Jonge W.J. et al. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway // *Nat. Immunol.* 2005. Vol. 6, № 8. P. 844–851.
  14. Huston J.M. et al. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis // *J. Exp. Med.* 2006. Vol. 203, № 7. P. 1623–1629.
  15. Miyazawa A., Fujiyoshi Y., Unwin N. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore // *Nature*. Nature Publishing Group, 2003. Vol. 423, № 6943. P. 949–955.
  16. Matsunaga K. et al. Involvement of Nicotinic Acetylcholine Receptors in Suppression of Antimicrobial Activity and Cytokine Responses of Alveolar Macrophages to *Legionella pneumophila* Infection by Nicotine // *J. Immunol.* The American Association of Immunologists, 2001. Vol. 167, № 11. P. 6518–6524.
  17. Fujii T. et al. Constitutive expression of mRNA for the same choline acetyltransferase as that in the nervous system, an acetylcholine-synthesizing enzyme, in human leukemic T-cell lines // *Neurosci. Lett.* 1999. Vol. 259, № 2. P. 71–74.
  18. Gahring L.C., Rogers S.W. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression and function on nonneuronal cells // *AAPS Journal*. 2006. Vol. 7, № 4.
  19. Lukas R.J. et al. International union of pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits //

- Pharmacological Reviews. American Society for Pharmacology and Experimental Therapy, 1999. Vol. 51, № 2. P. 397–401.
20. Drisdell R.C., Green W.N. Neuronal alpha-bungarotoxin receptors are alpha7 subunit homomers. // J. Neurosci. 2000. Vol. 20, № 1. P. 133–139.
  21. Williams D.K., Wang J., Papke R.L. Positive allosteric modulators as an approach to nicotinic acetylcholine receptor-targeted therapeutics: Advantages and limitations // Biochemical Pharmacology. 2011.
  22. Hendrickson L.M., Guildford M.J., Tapper A.R. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: Common molecular substrates of nicotine and alcohol dependence // Frontiers in Psychiatry. Frontiers Media SA, 2013. Vol. 4, № APR.
  23. Rangwala F. et al. Neuronal  $\alpha$ -bungarotoxin receptors differ structurally from other nicotinic acetylcholine receptors // J. Neurosci. Society for Neuroscience, 1997. Vol. 17, № 21. P. 8201–8212.
  24. Khiroug S.S. et al. Rat nicotinic ACh receptor  $\alpha$ 7 and  $\beta$ 2 subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels // J. Physiol. 2002. Vol. 540, № 2. P. 425–434.
  25. Williams M.E. et al. Ric-3 promotes functional expression of the nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha$ 7 subunit in mammalian cells // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280, № 2. P. 1257–1263.
  26. Boyd R.T. The molecular biology of neuronal nicotinic acetylcholine receptors // Critical Reviews in Toxicology. Informa Healthcare, 1997. Vol. 27, № 3. P. 299–318.
  27. Colquhoun L.M., Patrick J.W. Pharmacology of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtypes // Adv. Pharmacol. 1997. Vol. 39, № C. P. 191–220.
  28. De Jonge W.J., Ulloa L. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a

- pharmacological target for inflammation // *British Journal of Pharmacology*. Wiley-Blackwell, 2007. Vol. 151, № 7. P. 915–929.
29. Galzi J.L. et al. Functional significance of aromatic amino acids from three peptide loops of the  $\alpha 7$  neuronal nicotinic receptor site investigated by site-directed mutagenesis // *FEBS Lett.* 1991. Vol. 294, № 3. P. 198–202.
  30. Bertrand D. et al. Mutations at two distinct sites within the channel domain M2 alter calcium permeability of neuronal  $\alpha 7$  nicotinic receptor // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences*, 1993. Vol. 90, № 15. P. 6971–6975.
  31. Berg D.K., Conroy W.G. Nicotinic  $\alpha 7$  receptors: Synaptic options and downstream signaling in neurons // *J. Neurobiol.* 2002. Vol. 53, № 4. P. 512–523.
  32. Charpantier E. et al.  $\alpha 7$  neuronal nicotinic acetylcholine receptors are negatively regulated by tyrosine phosphorylation and Src-family kinases // *J. Neurosci.* 2005. Vol. 25, № 43. P. 9836–9849.
  33. Gault J. et al. Comparison of polymorphisms in the  $\alpha 7$  nicotinic receptor gene and its partial duplication in schizophrenic and control subjects // *Am. J. Med. Genet. Wiley*, 2003. Vol. 123B, № 1. P. 39–49.
  34. Villiger Y. et al. Expression of an  $\alpha 7$  duplicate nicotinic acetylcholine receptor-related protein in human leukocytes // *J. Neuroimmunol.* 2002. Vol. 126, № 1–2. P. 86–98.
  35. Severance E.G. et al. The  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor subunit exists in two isoforms that contribute to functional ligand-gated ion channels // *Mol. Pharmacol.* 2004. Vol. 66, № 3. P. 420–429.
  36. Reardon C. et al. Lymphocyte-derived ACh regulates local innate but not adaptive immunity // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences*, 2013. Vol. 110, № 4. P. 1410–1415.



37. Skok M. V. et al. Functional nicotinic acetylcholine receptors are expressed in B lymphocyte-derived cell lines // *Mol. Pharmacol.* 2003.
38. Sudheer P.S. et al. Nicotinic acetylcholine receptors on basophils and mast cells // *Anaesthesia*. *Anaesthesia*, 2006. Vol. 61, № 12. P. 1170–1174.
39. Razani-Boroujerdi S. et al. T Cells Express  $\alpha 7$ -Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits That Require a Functional TCR and Leukocyte-Specific Protein Tyrosine Kinase for Nicotine-Induced  $Ca^{2+}$  Response // *J. Immunol.* 2007.
40. Fujii T. et al. Expression and function of the cholinergic system in immune cells // *Frontiers in Immunology*. *Frontiers Media S.A.*, 2017. Vol. 8, № SEP.
41. De Rosa M.J. et al. Relationship between  $\alpha 7$  nAChR and apoptosis in human lymphocytes // *J. Neuroimmunol.* Elsevier, 2005. Vol. 160, № 1–2. P. 154–161.
42. Skok M. et al. The role of nicotinic acetylcholine receptors in lymphocyte development // *J. Neuroimmunol.* 2006. Vol. 171, № 1–2. P. 86–98.
43. Fujii T. et al. Physiological functions of the cholinergic system in immune cells // *Journal of Pharmacological Sciences*. *Japanese Pharmacological Society*, 2017. Vol. 134, № 1. P. 1–21.
44. Nizri E. et al. Anti-inflammatory properties of cholinergic up-regulation: A new role for acetylcholinesterase inhibitors // *Neuropharmacology*. 2006. Vol. 50, № 5. P. 540–547.
45. Kawashima K., Fujii T. Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. // *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2004. Vol. 9. P. 2063–2085.
46. Rosas-Ballina M. et al. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit // *Science (80-. )*. American Association for

- the Advancement of Science, 2011. Vol. 334, № 6052. P. 98–101.
47. Kawashima K., Fujii T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity // *Life Sciences*. Elsevier Inc., 2003. Vol. 74, № 6. P. 675–696.
  48. Fujii T. et al. Localization and synthesis of acetylcholine in human leukemic T cell lines // *J. Neurosci. Res.* John Wiley & Sons, Ltd, 1996. Vol. 44, № 1. P. 66–72.
  49. De Rosa M.J. et al. Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor modulates lymphocyte activation // *Life Sci.* *Life Sci*, 2009. Vol. 85, № 11–12. P. 444–449.
  50. Wang D.W. et al. Stimulation of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor by nicotine increases suppressive capacity of naturally occurring CD4+CD25 + regulatory T cells in mice in vitro // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *J Pharmacol Exp Ther*, 2010. Vol. 335, № 3. P. 553–561.
  51. Nordman J.C. et al. The  $\alpha 4$  nicotinic receptor promotes CD4+ T-Cell proliferation and a helper T-cell immune response // *Mol. Pharmacol.* *Mol Pharmacol*, 2014. Vol. 85, № 1. P. 50–61.
  52. Schleinitz N. et al. Natural killer cells in human autoimmune diseases // *Immunology*. Wiley-Blackwell, 2010. Vol. 131, № 4. P. 451–458.
  53. Ferlazzo G., Morandi B. Cross-talks between natural killer cells and distinct subsets of dendritic cells // *Frontiers in Immunology*. Frontiers Research Foundation, 2014. Vol. 5, № APR.
  54. Zwirner N.W., Domaica C.I. Cytokine regulation of natural killer cell effector functions // *BioFactors*. *Biofactors*, 2010. Vol. 36, № 4. P. 274–288.
  55. Zanetti S.R. et al. Expression and functional role of  $\alpha 7$  nicotinic receptor in human cytokine-stimulated natural killer (NK) cells // *J. Biol. Chem.* 2016.

56. Skok M., Grailhe R., Changeux J.P. Nicotinic receptors regulate B lymphocyte activation and immune response // *Eur. J. Pharmacol.* 2005. Vol. 517, № 3. P. 246–251.
57. Koval L. et al.  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors are involved in suppression of the antibody immune response // *J. Neuroimmunol.* Elsevier B.V., 2018. Vol. 318. P. 8–14.
58. Aicher A. et al. Nicotine strongly activates dendritic cell-mediated adaptive immunity: Potential role for progression of atherosclerotic lesions // *Circulation.* 2003.
59. Nouri-Shirazi M., Guinet E. Evidence for the immunosuppressive role of nicotine on human dendritic cell functions // *Immunology.* Wiley-Blackwell, 2003. Vol. 109, № 3. P. 365–373.
60. Guinet E., Yoshida K., Nouri-Shirazi M. Nicotinic environment affects the differentiation and functional maturation of monocytes derived dendritic cells (DCs) // *Immunol. Lett.* 2004. Vol. 95, № 1. P. 45–55.
61. Hamano R. et al. Stimulation of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor inhibits CD14 and the toll-like receptor 4 expression in human monocytes // *Shock.* 2006. Vol. 26, № 4. P. 358–364.
62. Rosas-Ballina M. et al. The selective  $\alpha 7$  agonist GTS-21 attenuates cytokine production in human whole blood and human monocytes activated by ligands for TLR2, TLR3, TLR4, TLR9, and RAGE // *Mol. Med.* 2009.
63. Shytle R.D. et al. Cholinergic modulation of microglial activation by  $\alpha 7$  nicotinic receptors // *J. Neurochem.* *J Neurochem*, 2004. Vol. 89, № 2. P. 337–343.
64. Sopori M. Effects of cigarette smoke on the immune system // *Nature Reviews Immunology.* European Association for Cardio-Thoracic Surgery, 2002. Vol. 2, № 5. P. 372–377.

65. Nuorti J.P. et al. Cigarette smoking and invasive pneumococcal disease // *N. Engl. J. Med.* 2000. Vol. 342, № 10. P. 681–689.
66. Barnes P.J. New Concepts in Chronic Obstructive Pulmonary Disease // *Annu. Rev. Med. Annual Reviews*, 2003. Vol. 54, № 1. P. 113–129.
67. Sørensen L.T. et al. Effect of smoking and abstention on oxidative burst and reactivity of neutrophils and monocytes // *Surgery*. 2004. Vol. 136, № 5. P. 1047–1053.
68. Speer P. et al. Effects of nicotine on intercellular adhesion molecule expression in endothelial cells and integrin expression in neutrophils in vitro // *Am. J. Obstet. Gynecol.* Mosby Inc., 2002. Vol. 186, № 3. P. 551–556.
69. Iho S. et al. Nicotine induces human neutrophils to produce IL-8 through the generation of peroxynitrite and subsequent activation of NF- $\kappa$ B // *J. Leukoc. Biol.* Wiley, 2003. Vol. 74, № 5. P. 942–951.
70. Aoshiba K. et al. Nicotine prolongs neutrophil survival by suppressing apoptosis // *J. Lab. Clin. Med.* Mosby Inc., 1996. Vol. 127, № 2. P. 186–194.
71. Safronova V.G. et al. Nicotinic receptor involvement in regulation of functions of mouse neutrophils from inflammatory site // *Immunobiology.* Elsevier GmbH, 2016. Vol. 221, № 7. P. 761–772.
72. Radosa J. et al. The cholinergic system in guttate psoriasis with special reference to mast cells // *Experimental Dermatology. Exp Dermatol*, 2011. Vol. 20, № 8. P. 677–679.
73. Mishra N.C. et al. Nicotine Inhibits Fc $\epsilon$ RI-Induced Cysteinyl Leukotrienes and Cytokine Production without Affecting Mast Cell Degranulation Through  $\alpha$ 7/ $\alpha$ 9/ $\alpha$ 10-Nicotinic Receptors // *J. Immunol. The American Association of Immunologists*, 2010. Vol. 185, № 1. P. 588–596.
74. Kageyama-Yahara N. et al. IgE-induced degranulation of mucosal mast cells is negatively regulated via nicotinic acetylcholine receptors // *Biochem.*

- Biophys. Res. Commun. Academic Press, 2008. Vol. 377, № 1. P. 321–325.
75. Suzuki T. et al. Microglial  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase C/IP3 pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role // J. Neurosci. Res. John Wiley & Sons, Ltd, 2006. Vol. 83, № 8. P. 1461–1470.
  76. De Simone R. et al. Activation of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor by nicotine selectively up-regulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in rat microglial cultures // J. Neuroinflammation. 2005. Vol. 2.
  77. Streit W.J. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS // GLIA. 2002. Vol. 40, № 2. P. 133–139.
  78. Chen Z., Trapp B.D. Microglia and neuroprotection // Journal of Neurochemistry. Blackwell Publishing Ltd, 2016. Vol. 136. P. 10–17.
  79. Shytle R.D. et al. Cholinergic modulation of microglial activation by  $\alpha 7$  nicotinic receptors // J. Neurochem. 2004. Vol. 89, № 2. P. 337–343.
  80. Zhang J., Rivest S. Anti-inflammatory effects of prostaglandin E2 in the central nervous system in response to brain injury and circulating lipopolysaccharide // J. Neurochem. 2001. Vol. 76, № 3. P. 855–864.
  81. Hellström-Lindahl E. et al. Reduced levels of A $\beta$  40 and A $\beta$  42 in brains of smoking controls and Alzheimer's patients // Neurobiol. Dis. 2004. Vol. 15, № 2. P. 351–360.
  82. Wang H.Y. et al. Amyloid peptide A $\beta$ 1-42 binds selectively and with picomolar affinity to  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors // J. Neurochem. 2000. Vol. 75, № 3. P. 1155–1161.
  83. Wang H.Y. et al.  $\beta$ -Amyloid1-42 binds to  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275, № 8. P. 5626–5632.

84. Shaw S., Bencherif M., Marrero M.B. Angiotensin II Blocks Nicotine-Mediated Neuroprotection against  $\beta$ -Amyloid (1-42) via Activation of the Tyrosine Phosphatase SHP-1 // *J. Neurosci. Society for Neuroscience*, 2003. Vol. 23, № 35. P. 11224–11228.
85. Marrero M.B., Papke R.L., Bhatti B.S. The neuroprotective effect of 2-(3-pyridyl)-1-azabicyclo[3.2.2]nonane (TC-1698), a novel  $\alpha 7$  ligand, is prevented through angiotensin II activation of a tyrosine phosphatase // *Pharmacology*. 2003. Vol. 309, № 1. P. 16–27.
86. Shaw S., Bencherif M., Marrero M.B. Janus kinase 2, an early target of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection against  $A\beta$ -(1-42) amyloid // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 47. P. 44920–44924.
87. Arredondo J. et al. Receptor-mediated tobacco toxicity: cooperation of the Ras/Raf-1/MEK1/ERK and JAK-2/STAT-3 pathways downstream of a  $\alpha 7$  nicotinic receptor in oral keratinocytes // *FASEB J. Wiley*, 2006. Vol. 20, № 12. P. 2093–2101.
88. Blanchet M.R. et al. Dimethylphenylpiperazinium, a nicotinic receptor agonist, downregulates inflammation in monocytes/macrophages through PI3K and PLC chronic activation // *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 2006. Vol. 291, № 4.
89. Corradi J., Bouzat C. Understanding the bases of function and modulation of  $\alpha 7$  nicotinic receptors: implications for drug discovery // *Molecular Pharmacology. American Society for Pharmacology and Experimental Therapy*, 2016. Vol. 90, № 3. P. 288–299.
90. Wang H. et al. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis // *Nat. Med. Nat Med*, 2004. Vol. 10, № 11. P. 1216–1221.
91. Rioux N., Castonguay A. The induction of cyclooxygenase-1 by a tobacco

- carcinogen in U937 human macrophages is correlated to the activation of NF- $\kappa$ B // *Carcinogenesis*. 2000. Vol. 21, № 9. 1745–1751 p.
92. Saeed R.W. et al. Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation // *J. Exp. Med. J Exp Med*, 2005. Vol. 201, № 7. P. 1113–1123.
  93. Levy D.E., Lee C. What does Stat3 do? // *J. Clin. Invest. American Society for Clinical Investigation*, 2002. Vol. 109, № 9. P. 1143–1148.
  94. Murray P.J. The primary mechanism of the IL-10-regulated antiinflammatory response is to selectively inhibit transcription // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. Vol. 102, № 24. P. 8686–8691.
  95. Jenkins B.J. et al. Hyperactivation of Stat3 in gp130 mutant mice promotes gastric hyperproliferation and desensitizes TGF- $\beta$  signaling // *Nat. Med. Nature Publishing Group*, 2005. Vol. 11, № 8. P. 845–852.
  96. Yoshida Y. et al. Interleukin 1 Activates STAT3/Nuclear Factor- $\kappa$ B Cross-talk via a Unique TRAF6- and p65-dependent Mechanism // *J. Biol. Chem. J Biol Chem*, 2004. Vol. 279, № 3. P. 1768–1776.
  97. Hoentjen F. et al. STATS regulates NF- $\kappa$ B recruitment to the IL-12p40 promoter in dendritic cells // *Blood. Blood*, 2005. Vol. 105, № 2. P. 689–696.
  98. Heeschen C. et al. Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis // *Nat. Med. Nature Publishing Group*, 2001. Vol. 7, № 7. P. 833–839.
  99. Ulloa L. The vagus nerve and the nicotinic anti-inflammatory pathway // *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005. Vol. 4, № 8. P. 673–684.
  100. Kitagawa H. et al. Safety, pharmacokinetics, and effects on cognitive function of multiple doses of GTS-21 in healthy, male volunteers // *Neuropsychopharmacology. Neuropsychopharmacology*, 2003. Vol. 28, № 3. P. 542–551.

101. Olincy A. et al. Proof-of-concept trial of an  $\alpha 7$  nicotinic agonist in schizophrenia // Arch. Gen. Psychiatry. Arch Gen Psychiatry, 2006. Vol. 63, № 6. P. 630–638.
102. van Westerloo D.J. et al. The Vagus Nerve and Nicotinic Receptors Modulate Experimental Pancreatitis Severity in Mice // Gastroenterology. W.B. Saunders, 2006. Vol. 130, № 6. P. 1822–1830.
103. Martin L.F., Kem W.R., Freedman R. Alpha-7 nicotinic receptor agonists: Potential new candidates for the treatment of schizophrenia // Psychopharmacology. Springer Verlag, 2004. Vol. 174, № 1. P. 54–64.
104. Papadopoulos N. et al. Does cigarette smoking influence disease expression, activity and severity in early rheumatoid arthritis patients? // undefined. 2005.
105. Akk G., Steinbach J.H. Galantamine activates muscle-type nicotinic acetylcholine receptors without binding to the acetylcholine-binding site // J. Neurosci. J Neurosci, 2005. Vol. 25, № 8. P. 1992–2001.
106. Pinheiro N.M. et al. Acute lung injury is reduced by the  $\alpha 7$ nAChR agonist PNU-282987 through changes in the macrophage profile // FASEB J. FASEB, 2017. Vol. 31, № 1. P. 320–332.
107. Su X. et al. Activation of the  $\alpha 7$  nAChR reduces acid-induced acute lung injury in mice and rats // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. Vol. 37, № 2. P. 186–192.
108. He Y. et al. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor activation attenuated intestine-derived acute lung injury // J. Surg. Res. Academic Press Inc., 2016. Vol. 201, № 2. P. 258–265.
109. Shao Z. et al. Protective effects of PNU-282987 on sepsis-induced acute lung injury in mice // Mol. Med. Rep. Spandidos Publications, 2019. Vol. 49, № 5. P. 3791–3798.



110. Dinarello C.A., Simon A., Van Der Meer J.W.M. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases // *Nature Reviews Drug Discovery*. *Nat Rev Drug Discov*, 2012. Vol. 11, № 8. P. 633–652.
111. Lamkanfi M., Dixit V.M. Mechanisms and functions of inflammasomes // *Cell*. *Cell Press*, 2014. Vol. 157, № 5. P. 1013–1022.
112. Olofsson P.S. et al. Rethinking inflammation: Neural circuits in the regulation of immunity // *Immunol. Rev.* *Immunol Rev*, 2012. Vol. 248, № 1. P. 188–204.
113. Grabitzki J., Lochnit G. Immunomodulation by phosphocholine-Biosynthesis, structures and immunological implications of parasitic PC-epitopes // *Molecular Immunology*. *Mol Immunol*, 2009. Vol. 47, № 2–3. P. 149–163.
114. Driscoll T.P. et al. Wholly rickettsia! reconstructed metabolic profile of the quintessential bacterial parasite of eukaryotic cells // *MBio*. *American Society for Microbiology*, 2017. Vol. 8, № 5.
115. Hecker A. et al. Phosphocholine-Modified Macromolecules and Canonical Nicotinic Agonists Inhibit ATP-Induced IL-1 $\beta$  Release // *J. Immunol.* *The American Association of Immunologists*, 2015. Vol. 195, № 5. P. 2325–2334.
116. Richter K. et al. Phosphocholine-an agonist of metabotropic but not of ionotropic functions of  $\alpha 9$ -containing nicotinic acetylcholine receptors // *Sci. Rep.* *Nature Publishing Group*, 2016. Vol. 6.
117. Muñoz-Planillo R. et al. K<sup>+</sup> Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter // *Immunity*. *NIH Public Access*, 2013. Vol. 38, № 6. P. 1142–1153.
118. Chock P.B., Titus E.O. *Alkali Metal Ion Transport and Biochemical Activity*. *John Wiley & Sons, Ltd*, 2007. P. 287–382.

119. Khakh B.S. et al. An angstrom scale interaction between plasma membrane ATP-gated P2X 2 and  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic channels measured with fluorescence resonance energy transfer and total internal reflection fluorescence microscopy // *J. Neurosci.* *J Neurosci*, 2005. Vol. 25, № 29. P. 6911–6920.
120. Verbitsky M. et al. Mixed nicotinic-muscarinic properties of the  $\alpha 9$  nicotinic cholinergic receptor // *Neuropharmacology*. Elsevier Ltd, 2000. Vol. 39, № 13. P. 2515–2524.
121. Tu A.T. Overview of snake venom chemistry // *Adv. Exp. Med. Biol.* Springer New York LLC, 1996. Vol. 391. P. 37–62.
122. Salazar A.M. et al. Venom variation in hemostasis of the southern Pacific rattlesnake (*Crotalus oreganus helleri*): Isolation of hellerase // *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* Elsevier Inc., 2009. Vol. 149, № 3. P. 307–316.
123. Burke J.E., Dennis E.A. Phospholipase A2 biochemistry // *Cardiovascular Drugs and Therapy*. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2009. Vol. 23, № 1. P. 49–59.
124. Filkin S.Y., Lipkin A. V., Fedorov A.N. Phospholipase Superfamily: Structure, Functions, and Biotechnological Applications // *Biochemistry (Moscow)*. Pleiades Publishing, 2020. Vol. 85, № 1. P. 177–195.
125. Gutiérrez J.M., Lomonte B. Phospholipases A2: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins // *Toxicon*. *Toxicon*, 2013. Vol. 62. P. 27–39.
126. Méndez R. et al. Proteomic profiling, functional characterization, and immunoneutralization of the venom of *Porthidium porrasii*, a pitviper endemic to Costa Rica // *Acta Trop.* Elsevier B.V., 2019. Vol. 193. P. 113–123.
127. Pražnikar Z.J., Petan T., Pungercar J. A neurotoxic secretory phospholipase A2 induces apoptosis in motoneuron-like cells // *Annals of the New York*

- Academy of Sciences. Blackwell Publishing Inc., 2009. Vol. 1152. P. 215–224.
128. Gutiérrez J.M. et al. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A2: Comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA2 homologue // *Toxicon*. *Toxicon*, 2008. Vol. 51, № 1. P. 80–92.
  129. Zhang H. et al. Structure of a cardiotoxic phospholipase A2 from *Ophiophagus hannah* with the “pancreatic loop” // *J. Struct. Biol.* 2002. Vol. 138, № 3. P. 207–215.
  130. Satish S. et al. Purification of a Class B1 platelet aggregation inhibitor phospholipase A2 from Indian cobra (*Naja Naja*) venom // *Biochimie*. *Biochimie*, 2004. Vol. 86, № 3. P. 203–210.
  131. Zhao K., Zhou Y., Lin Z. Structure of basic phospholipase A2 from *Agkistrodon halys* Pallas: Implications for its association, hemolytic and anticoagulant activities // *Toxicon*. *Toxicon*, 2000. Vol. 38, № 7. P. 901–916.
  132. Yamaguchi Y. et al. Characterization, amino acid sequence and evolution of edema-inducing, basic phospholipase A2 from *Trimeresurus flavoviridis* venom // *Toxicon*. *Toxicon*, 2001. Vol. 39, № 7. P. 1069–1076.
  133. Šribar J., Oberčkal J., Križaj I. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A2: An update // *Toxicon*. Elsevier Ltd, 2014. Vol. 89. P. 9–16.
  134. Vulfius C.A. et al. Pancreatic and snake venom presynaptically active phospholipases A2 inhibit nicotinic acetylcholine receptors // *PLoS One*. Public Library of Science, 2017. Vol. 12, № 10.
  135. Paoli M. et al. Mass spectrometry analysis of the phospholipase A2 activity of snake pre-synaptic neurotoxins in cultured neurons // *J. Neurochem. J Neurochem*, 2009. Vol. 111, № 3. P. 737–744.
  136. Ranawaka U.K., Lalloo D.G., de Silva H.J. Neurotoxicity in Snakebite—The

- Limits of Our Knowledge // PLoS Negl. Trop. Dis. / ed. White J. Public Library of Science, 2013. Vol. 7, № 10. P. e2302.
137. Dennis E.A. et al. Phospholipase A2 enzymes: Physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention // Chemical Reviews. NIH Public Access, 2011. Vol. 111, № 10. P. 6130–6185.
  138. Montecucco C., Gutiérrez J.M., Lomonte B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: Common aspects of their mechanisms of action // Cellular and Molecular Life Sciences. Cell Mol Life Sci, 2008. Vol. 65, № 18. P. 2897–2912.
  139. Snake Venom Phospholipase A2 Enzymes // Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles. CRC Press, 2020. P. 189–222.
  140. Harris J.B., Scott-Davey T. Secreted phospholipases A2 of snake venoms: Effects on the peripheral neuromuscular system with comments on the role of phospholipases A2 in disorders of the CNS and their uses in industry // Toxins. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2013. Vol. 5, № 12. P. 2533–2571.
  141. Davidson F.F., Dennis E.A. Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A2 from snake venom to human secreted forms // J. Mol. Evol. Springer-Verlag, 1990. Vol. 31, № 3. P. 228–238.
  142. Huang M.Z. et al. Complete amino acid sequence of an acidic, cardiotoxic phospholipase A2 from the venom of *Ophiophagus hannah* (King cobra): A novel cobra venom enzyme with “pancreatic loop” // Arch. Biochem. Biophys. Academic Press Inc., 1997. Vol. 338, № 2. P. 150–156.
  143. Xiao H. et al. Snake Venom PLA2, a Promising Target for Broad-Spectrum Antivenom Drug Development // Biomed Res. Int. Hindawi Limited, 2017. Vol. 2017.

144. J. WARD R. et al. Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A2: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis // *Biochem. J.* Portland Press Ltd., 2002. Vol. 362, № 1. P. 89.
145. Kang T.S. et al. Enzymatic toxins from snake venom: Structural characterization and mechanism of catalysis // *FEBS Journal.* FEBS J, 2011. Vol. 278, № 23. P. 4544–4576.
146. Scott D.L. et al. Interfacial catalysis: The mechanism of phospholipase A2 // *Science* (80-. ). NIH Public Access, 1990. Vol. 250, № 4987. P. 1541–1546.
147. Conlon J.M. et al. Cytotoxic activities of [Ser49]phospholipase A2 from the venom of the saw-scaled vipers *Echis ocellatus*, *Echis pyramidum leakeyi*, *Echis carinatus sochureki*, and *Echis coloratus* // *Toxicon.* Pergamon, 2013. Vol. 71. P. 96–104.
148. Petan T., Križaj I., Pungercar J. Restoration of enzymatic activity in a Ser-49 phospholipase A2 homologue decreases its Ca<sup>2+</sup>-independent membrane-damaging activity and increases its toxicity // *Biochemistry.* Biochemistry, 2007. Vol. 46, № 44. P. 12795–12809.
149. Fujisawa D. et al. Catalytically inactive phospholipase A2 homologue binds to vascular endothelial growth factor receptor-2 via a C-terminal loop region // *Biochem. J.* Biochem J, 2008. Vol. 411, № 3. P. 515–522.
150. Lomonte B., Angulo Y., Moreno E. Synthetic Peptides Derived from the C-Terminal Region of Lys49 Phospholipase A2 Homologues from Viperidae Snake Venoms: Biomimetic Activities and Potential Applications // *Curr. Pharm. Des.* Bentham Science Publishers Ltd., 2010. Vol. 16, № 28. P. 3224–3230.
151. Benati R.B. et al. Cytotoxic and pro-apoptotic action of MjTX-I, a phospholipase A2 isolated from *Bothrops moojeni* snake venom, towards leukemic cells // *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* BioMed Central

- Ltd., 2018. Vol. 24, № 1.
152. da Silva C.P. et al. Antitumor potential of the myotoxin BthTX-I from *Bothrops jararacussu* snake venom: Evaluation of cell cycle alterations and death mechanisms induced in tumor cell lines // *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* BioMed Central Ltd., 2015. Vol. 21, № 1.
  153. Marcussi S. et al. Evaluation of the genotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and its isolated toxins on human lymphocytes // *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. Mutat Res*, 2011. Vol. 724, № 1–2. P. 59–63.
  154. Khunsap S. et al. Anticancer properties of phospholipase A2 from *Daboia siamensis* venom on human skin melanoma cells // *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* BioMed Central Ltd., 2016. Vol. 22, № 1. P. 7.
  155. Marcussi S. et al. Genotoxic effect of *Bothrops* snake venoms and isolated toxins on human lymphocyte DNA // *Toxicon*. *Toxicon*, 2013. Vol. 65. P. 9–14.
  156. Gebrim L.C. et al. Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A2-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region // *Biologicals*. *Biologicals*, 2009. Vol. 37, № 4. P. 222–229.
  157. Khunsap S. et al. Purification of a phospholipase A(2) from *Daboia russelii siamensis* venom with anticancer effects. // *J. Venom Res. Library Publishing Media*, 2011. Vol. 2. P. 42–51.
  158. Cura J.E. et al. Phase I and Pharmacokinetics Study of Crotoxin (Cytotoxic PLA2, NSC-624244) in Patients with Advanced Cancer // *Clin. Cancer Res.* 2002. Vol. 8, № 4.
  159. Lugo D., Krogstad P. Enteroviruses in the early 21st century: New manifestations and challenges // *Current Opinion in Pediatrics*. Lippincott

- Williams and Wilkins, 2016. Vol. 28, № 1. P. 107–113.
160. Braaten K.P., Laufer M.R. Human Papillomavirus (HPV), HPV-Related Disease, and the HPV Vaccine. // *Rev. Obstet. Gynecol. MedReviews, LLC*, 2008. Vol. 1, № 1. P. 2–10.
  161. Margolis D.M. et al. Curing HIV: Seeking to Target and Clear Persistent Infection // *Cell. Cell Press*, 2020. Vol. 181, № 1. P. 189–206.
  162. Koelle D.M., Corey L. Herpes simplex: Insights on pathogenesis and possible vaccines // *Annual Review of Medicine. Annu Rev Med*, 2008. Vol. 59. P. 381–395.
  163. Carroll M.W. et al. Temporal and spatial analysis of the 2014-2015 Ebola virus outbreak in West Africa // *Nature. Nature Publishing Group*, 2015. Vol. 524, № 7563. P. 97–101.
  164. Heukelbach J. et al. Zika virus outbreak in Brazil // *J. Infect. Dev. Ctries. Journal of Infection in Developing Countries*, 2016. Vol. 10, № 2. P. 116–120.
  165. Neumann G., Noda T., Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus // *Nature. Nature*, 2009. Vol. 459, № 7249. P. 931–939.
  166. Collins N.D., Barrett A.D.T. Live Attenuated Yellow Fever 17D Vaccine: A Legacy Vaccine Still Controlling Outbreaks In Modern Day // *Current Infectious Disease Reports. Current Medicine Group LLC* 1, 2017. Vol. 19, № 3.
  167. Wu D. et al. The SARS-CoV-2 outbreak: What we know // *International Journal of Infectious Diseases. Elsevier B.V.*, 2020. Vol. 94. P. 44–48.
  168. Smith K.F. et al. Global rise in human infectious disease outbreaks // *J. R. Soc. Interface. Royal Society of London*, 2014. Vol. 11, № 101.

169. Shi M. et al. The evolutionary history of vertebrate RNA viruses // Nature. Nature Publishing Group, 2018. Vol. 556, № 7700. P. 197–202.
170. Palese P. Influenza: Old and new threats // Nature Medicine. Nat Med, 2004. Vol. 10, № 12S. P. S82–S87.
171. Krammer F. Emerging influenza viruses and the prospect of a universal influenza virus vaccine // Biotechnology Journal. Wiley-VCH Verlag, 2015. Vol. 10, № 5. P. 690–701.
172. Qin L. et al. Prediction of number of cases of 2019 novel coronavirus (COVID-19) using social media search index // Int. J. Environ. Res. Public Health. MDPI AG, 2020. Vol. 17, № 7.
173. Bhatt S. et al. The global distribution and burden of dengue // Nature. Nature Publishing Group, 2013. Vol. 496, № 7446. P. 504–507.
174. Thorley J.A., McKeating J.A., Rappoport J.Z. Mechanisms of viral entry: Sneaking in the front door // Protoplasma. Protoplasma, 2010. Vol. 244, № 1. P. 15–24.
175. Rodenhuis-Zybert I.A., Wilschut J., Smit J.M. Dengue virus life cycle: Viral and host factors modulating infectivity // Cellular and Molecular Life Sciences. Cell Mol Life Sci, 2010. Vol. 67, № 16. P. 2773–2786.
176. Maslow J.N. The cost and challenge of vaccine development for emerging and emergent infectious diseases // The Lancet Global Health. Elsevier Ltd, 2018. Vol. 6, № 12. P. e1266–e1267.
177. Pour P.M. et al. The signaling pathways, and therapeutic targets of antiviral agents: Focusing on the antiviral approaches and clinical perspectives of anthocyanins in the management of viral diseases // Frontiers in Pharmacology. Frontiers Media S.A., 2019. Vol. 10.
178. Takashita E. Influenza Polymerase Inhibitors: Mechanisms of Action and Resistance // Cold Spring Harb. Perspect. Med. Cold Spring Harbor



- Laboratory, 2020. P. a038687.
179. Montessori V. et al. Adverse effects of antiretroviral therapy for HIV infection // *CMAJ. Canadian Medical Association*, 2004. Vol. 170, № 2. P. 229–238.
  180. Atanasov A.G. et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities // *Nature Reviews Drug Discovery. Nature Research*, 2021. P. 1–17.
  181. El-Aziz T.M.A., Soares A.G., Stockand J.D. Snake venoms in drug discovery: Valuable therapeutic tools for life saving // *Toxins. MDPI AG*, 2019. Vol. 11, № 10.
  182. Ma R., Mahadevappa R., Kwok H.F. Venom-based peptide therapy: Insights into anti-cancer mechanism // *Oncotarget. Impact Journals LLC*, 2017. Vol. 8, № 59. P. 100908–100930.
  183. Cushman D.W., Ondetti M.A. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme // *Hypertension. Hypertension*, 1991. Vol. 17, № 4. P. 589–592.
  184. Scarborough R.M. et al. Barbourin: A GPIIb-IIIa-specific integrin antagonist from the venom of *Sistrurus M. barbouri* // *J. Biol. Chem.* 1991. Vol. 266, № 15. P. 9359–9362.
  185. Gan Z.-R. et al. Echistatin. A potent platelet aggregation inhibitor from the venom of the viper, *Echis carinatus*. // *Journal of Biological Chemistry*. 1988. Vol. 263, № 36. 19827–19832 p.
  186. Funk C. et al. Reptilase®-R—A New Reagent in Blood Coagulation // *Br. J. Haematol. Br J Haematol*, 1971. Vol. 21, № 1. P. 43–52.
  187. Wang D.S. et al. Defibrinogenating effect of batroxobin (Defibrase®) in rats and inhibition of migration of human vascular smooth muscle cells by the plasma of batroxobin-treated rats in vitro // *Atherosclerosis. Atherosclerosis*,

2001. Vol. 156, № 1. P. 73–80.
188. de Morais N.C.G. et al. Isolation and characterization of moojenin, an acid-active, anticoagulant metalloproteinase from Bothrops moojeni venom // *Toxicon*. *Toxicon*, 2012. Vol. 60, № 7. P. 1251–1258.
189. Graziano F. et al. Aulogous fibrin sealant (Vivostat®) in the neurosurgical practice: Part II: Vertebro-spinal procedures // *Surg. Neurol. Int. Medknow Publications*, 2016. Vol. 7, № Suppl 3. P. S77–S82.
190. Waheed H., Moin S.F., Choudhary M.I. Snake Venom: From Deadly Toxins to Life-saving Therapeutics // *Curr. Med. Chem. Bentham Science Publishers Ltd.*, 2017. Vol. 24, № 17.
191. Soares A.M., Zuliani J.P. Toxins of Animal Venoms and Inhibitors: Molecular and Biotechnological Tools Useful to Human and Animal Health // *Curr. Top. Med. Chem. Bentham Science Publishers Ltd.*, 2019. Vol. 19, № 21. P. 1868–1871.
192. Prado-Franceschi J., Vital Brazil O. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* // *Toxicon*. *Toxicon*, 1981. Vol. 19, № 6. P. 875–887.
193. Alexander G. et al. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme // *Toxicon*. *Toxicon*, 1988. Vol. 26, № 10. P. 953–960.
194. Rübsamen K., Breithaupt H., Habermann B. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex - I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex // *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmakol. Springer-Verlag*, 1971. Vol. 270, № 3. P. 274–288.
195. Villarrubia V.G., Costa L.A., Díez R.A. Fosfolipasas A2 segregadas (sPLA2): ¿amigas o enemigas? ¿Actores de la resistencia antibacteriana y antivirus de la inmunodeficiencia humana? // *Med. Clin. (Barc)*. Elsevier BV,

2004. Vol. 123, № 19. P. 749–757.
196. Muller V.D.M. et al. Crotoxin and phospholipases A 2 from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses // *Toxicon*. *Toxicon*, 2012. Vol. 59, № 4. P. 507–515.
197. Cintra A.C.O. et al. Bothropstoxin-I: Amino acid sequence and function // *J. Protein Chem.* Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, 1993. Vol. 12, № 1. P. 57–64.
198. Muller V.D. et al. Phospholipase A2 isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus* inactivates dengue virus and other enveloped viruses by disrupting the viral envelope // *PLoS One*. Public Library of Science, 2014. Vol. 9, № 11.
199. Shimizu J.F. et al. Multiple effects of toxins isolated from *Crotalus durissus terrificus* on the hepatitis C virus life cycle // *PLoS One* / ed. Blackard J. Public Library of Science, 2017. Vol. 12, № 11. P. e0187857.
200. Bartenschlager R., Lohmann V., Penin F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection // *Nature Reviews Microbiology*. *Nat Rev Microbiol*, 2013. Vol. 11, № 7. P. 482–496.
201. Higuchi D.A. et al. Purification and partial characterization of two phospholipases A2 from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom // *Biochimie*. *Biochimie*, 2007. Vol. 89, № 3. P. 319–328.
202. Cecilio A.B. et al. Molecular characterization of Lys49 and Asp49 phospholipases A2 from snake venom and their antiviral activities against Dengue virus // *Toxins (Basel)*. *Toxins (Basel)*, 2013. Vol. 5, № 10. P. 1780–1798.
203. Alape-Girón A. et al. Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*. Geographic, individual, and ontogenetic variations // *J. Proteome Res.* *J Proteome Res*, 2008. Vol. 7, № 8. P. 3556–3571.

204. Kruglova N. et al. Different Neutralization Sensitivity of SARS-CoV-2 Cell-to-Cell and Cell-Free Modes of Infection to Convalescent Sera // *Viruses* 2021, Vol. 13, Page 1133. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2021. Vol. 13, № 6. P. 1133.
205. REED L.J., MUENCH H. A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS<sup>12</sup> // *Am. J. Epidemiol.* Oxford University Press, 1938. Vol. 27, № 3. P. 493–497.
206. Ianevski A., Giri A.K., Aittokallio T. SynergyFinder 2.0: visual analytics of multi-drug combination synergies // *Nucleic Acids Res.* Oxford Academic, 2020. Vol. 48, № W1. P. W488–W493.
207. A W. et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes // *Nucleic Acids Res.* *Nucleic Acids Res*, 2018. Vol. 46, № W1. P. W296–W303.
208. S L., JJ G. The RosettaDock server for local protein-protein docking // *Nucleic Acids Res.* *Nucleic Acids Res*, 2008. Vol. 36, № Web Server issue.
209. Tracey K.J. Reflex control of immunity // *Nature Reviews Immunology*. 2009.
210. Lee S.T. et al. Cholinergic anti-inflammatory pathway in intracerebral hemorrhage // *Brain Res.* 2010.
211. Martelli D., McKinley M.J., McAllen R.M. The cholinergic anti-inflammatory pathway: A critical review // *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 2014.
212. Sato K. et al. Extracellular signal-regulated kinase, stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase, and p38mapk are involved in IL-10-mediated selective repression of TNF-alpha-induced activation and maturation of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. // *J. Immunol.* 1999. Vol. 162, № 7. P. 3865–3872.

213. Wu J.C.F. et al. Cholinergic modulation of angiogenesis: Role of the 7 nicotinic acetylcholine receptor // *J. Cell. Biochem.* 2009. Vol. 108, № 2. P. 433–446.
214. Emilie L., Françoise L.R., Frank A. Lymphocytes prime activation is required for nicotine-induced calcium waves // *Front. Biosci. - Elit.* 2010.
215. Mikulski Z. et al. Nicotinic receptors on rat alveolar macrophages dampen ATP-induced increase in cytosolic calcium concentration // *Respir. Res. BioMed Central*, 2010. Vol. 11, № 1. P. 133.
216. Báez-Pagán C.A., Delgado-Vélez M., Lasalde-Dominicci J.A. Activation of the Macrophage  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptor and Control of Inflammation // *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2015.
217. Padilla A. et al. Effects of  $\alpha$ -conotoxin ImI on TNF- $\alpha$ , IL-8 and TGF- $\beta$  expression by human macrophage-like cells derived from THP-1 pre-monocytic leukemic cells // *Sci. Rep. Nature Publishing Group*, 2017. Vol. 7, № 1. P. 1–11.
218. Thorgersen E.B. et al. Systemic CD14 inhibition attenuates organ inflammation in porcine *Escherichia coli* sepsis // *Infect. Immun.* 2013.
219. Berenger B.M. et al. Membrane CD14, but not soluble CD14, is used by exoenzyme S from *P. aeruginosa* to signal proinflammatory cytokine production // *J. Leukoc. Biol.* 2011.
220. Egge K.H. et al. Post challenge inhibition of C3 and CD14 attenuates *Escherichia coli*-induced inflammation in human whole blood // *Innate Immun.* 2014.
221. Theodorakis E. et al. Macrophage phenotype in sepsis immunosuppression // *Crit. Care. Springer Nature*, 2015. Vol. 19, № Suppl 1. P. P44.
222. Cheng Y. et al. Park 7: A novel therapeutic target for macrophages in sepsis-induced immunosuppression // *Frontiers in Immunology.* 2018.

223. Zhuang Y. et al. Dynamic monitoring of monocyte HLA-DR expression for the diagnosis, prognosis, and prediction of sepsis // *Frontiers in Bioscience - Landmark*. 2017.
224. Lebedeva T., Dustin M.L., Sykulev Y. ICAM-1 co-stimulates target cells to facilitate antigen presentation // *Current Opinion in Immunology*. 2005.
225. Oberholzer A., Oberholzer C., Moldawer L.L. Interleukin-10: A complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug // *Critical Care Medicine*. 2002.
226. Li X. et al. Interleukin-10/lymphocyte ratio predicts mortality in severe septic patients // *PLoS One* / ed. Lazzeri C. Public Library of Science, 2017. Vol. 12, № 6. P. e0179050.
227. Bah I. et al. IL-10 induces an immune repressor pathway in sepsis by promoting S100A9 nuclear localization and MDSC development // *Cell. Immunol.* Academic Press Inc., 2018. Vol. 332. P. 32–38.
228. Urbonas V., Eidukaitė A., Tamulienė I. Increased interleukin-10 levels correlate with bacteremia and sepsis in febrile neutropenia pediatric oncology patients // *Cytokine*. 2012. Vol. 57, № 3. P. 313–315.
229. Mittal S.K. et al. Interleukin 10 (IL-10)-mediated Immunosuppression March-i induction regulates antigen presentation by macrophages but not Dendritic cells // *J. Biol. Chem.* American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., 2015. Vol. 290, № 45. P. 27158–27167.
230. Abrams J. et al. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes // *J. Exp. Med.* The Rockefeller University Press, 1991. Vol. 174, № 5. P. 1209–1220.
231. Randow F. et al. Mechanism of endotoxin desensitization: Involvement of interleukin 10 and transforming growth factor  $\beta$  // *J. Exp. Med.* The

- Rockefeller University Press, 1995. Vol. 181, № 5. P. 1887–1892.
232. Bogdan C., Vodovotz Y., Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10 // *J. Exp. Med.* The Rockefeller University Press, 1991. Vol. 174, № 6. P. 1549–1555.
233. Klava A. et al. Interleukin-10: A role in the development of postoperative immunosuppression // *Arch. Surg.* American Medical Association, 1997. Vol. 132, № 4. P. 425–429.
234. Flohé S.B. et al. Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response // *J. Leukoc. Biol.* 2006.
235. Wu H.P. et al. Serial cytokine levels in patients with severe sepsis // *Inflamm. Res.* 2009.
236. Shao R. et al. Monocyte programmed death ligand-1 expression after 3-4 days of sepsis is associated with risk stratification and mortality in septic patients: A prospective cohort study // *Crit. Care.* 2016.
237. Bertrand D., Gopalakrishnan M. Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors // *Biochem. Pharmacol.* 2007.
238. van Ton A.M.P. et al. Precision immunotherapy for sepsis // *Frontiers in Immunology.* 2018.
239. Wu D.D., Li T., Ji X.Y. Dendritic Cells in Sepsis: Pathological Alterations and Therapeutic Implications // *Journal of Immunology Research.* 2017.
240. Delano M.J., Ward P.A. The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome // *Immunological Reviews.* 2016.
241. Cekic C., Linden J. Purinergic regulation of the immune system // *Nature Reviews Immunology.* Nature Publishing Group, 2016. Vol. 16, № 3. P. 177–192.

242. Karmakar M. et al. Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 $\beta$  secretion in response to ATP // *Nat. Commun.* Nature Publishing Group, 2016. Vol. 7.
243. Mikhailov N. et al. Parasympathetic cholinergic and neuropeptide mechanisms of migraine // *Anesthesiol. Pain Med.* Kowsar Medical Publishing Company, 2017. Vol. 7, № 1.
244. Suleimanova A. et al. Modeling a Nociceptive Neuro-Immune Synapse Activated by ATP and 5-HT in Meninges: Novel Clues on Transduction of Chemical Signals Into Persistent or Rhythmic Neuronal Firing // *Front. Cell. Neurosci.* Frontiers Media S.A., 2020. Vol. 14.
245. Guzmán-Mejía F., López-Rubalcava C., González-Espinosa C. Stimulation of nAChR $\alpha$ 7 Receptor Inhibits TNF Synthesis and Secretion in Response to LPS Treatment of Mast Cells by Targeting ERK1/2 and TACE Activation // *J. Neuroimmune Pharmacol.* Springer New York LLC, 2018. Vol. 13, № 1. P. 39–52.
246. Kichko T.I. et al. Bimodal concentration-response of nicotine involves the nicotinic acetylcholine receptor, transient receptor potential vanilloid type 1, and transient receptor potential ankyrin 1 channels in mouse trachea and sensory neurons // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* J Pharmacol Exp Ther, 2013. Vol. 347, № 2. P. 529–539.
247. Oh M.-H. et al. TRPA1-Dependent Pruritus in IL-13–Induced Chronic Atopic Dermatitis // *J. Immunol.* The American Association of Immunologists, 2013. Vol. 191, № 11. P. 5371–5382.
248. Li L., Huang J., Lin Y. Snake venoms in cancer therapy: Past, present and future // *Toxins.* MDPI AG, 2018. Vol. 10, № 9.
249. Pathmanathan N., Balleine R.L. Ki67 and proliferation in breast cancer // *Journal of Clinical Pathology.* J Clin Pathol, 2013. Vol. 66, № 6. P. 512–516.



250. Calderon L.A. et al. Antitumoral activity of snake venom proteins: New trends in cancer therapy // *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation, 2014. Vol. 2014.
251. Chwetzoff S. et al. Nigexine, a phospholipase A2 from cobra venom with cytotoxic properties not related to esterase activity. Purification, amino acid sequence, and biological properties // *J. Biol. Chem.* Elsevier, 1989. Vol. 264, № 22. P. 13289–13297.
252. Liang Y.J. et al. Correlation of antitumor effect of recombinant sea snake basic phospholipase A2 to its enzymatic activity // *Ai Zheng*. BioMed Central Ltd., 2005. Vol. 24, № 12. P. 1474–1478.
253. Bazaia A. et al. MVL-PLA2, a phospholipase A2 from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, inhibits tumor cells adhesion and migration // *Matrix Biol.* Elsevier, 2009. Vol. 28, № 4. P. 188–193.
254. Araya C., Lomonte B. Antitumor effects of cationic synthetic peptides derived from Lys49 phospholipase A2 homologues of snake venoms // *Cell Biol. Int. Cell Biol Int*, 2007. Vol. 31, № 3. P. 263–268.
255. Ebrahim K. et al. Cobra venom cytotoxins; Apoptotic or necrotic agents? // *Toxicon*. Elsevier Ltd, 2015. Vol. 108. P. 134–140.
256. Attarde S.S., Pandit S. V. Cytotoxic activity of NN-32 toxin from Indian spectacled cobra venom on human breast cancer cell lines // *BMC Complement. Altern. Med.* BioMed Central Ltd., 2017. Vol. 17, № 1.
257. Thakur R. et al. Mechanism of apoptosis induction in human breast cancer MCF-7 cell by Ruviprase, a small peptide from *Daboia russelii russelii* venom // *Chem. Biol. Interact.* Elsevier Ireland Ltd, 2016. Vol. 258. P. 297–304.
258. Li Lee M. et al. Antiproliferative activity of King Cobra (*Ophiophagus hannah*) Venom l-Amino Acid Oxidase // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*

- Blackwell Publishing Ltd, 2014. Vol. 114, № 4. P. 336–343.
259. Salama W.H. et al. L-Amino acid oxidase from *Cerastes vipera* snake venom: Isolation, characterization and biological effects on bacteria and tumor cell lines // *Toxicon*. Elsevier Ltd, 2018. Vol. 150. P. 270–279.
260. Nalbantsoy A. et al. Combined venom profiling and cytotoxicity screening of the Radde's mountain viper (*Montivipera raddei*) and Mount Bulgar Viper (*Montivipera bulgardaghica*) with potent cytotoxicity against human A549 lung carcinoma cells // *Toxicon*. Elsevier Ltd, 2017. Vol. 135. P. 71–83.
261. Pathan J. et al. Daboialectin, a C-type lectin from Russell's viper venom induces cytoskeletal damage and apoptosis in human lung cancer cells in vitro // *Toxicon*. Elsevier Ltd, 2017. Vol. 127. P. 11–21.
262. Conlon J.M. et al. Peptides with in vitro anti-tumor activity from the venom of the Eastern green mamba, *Dendroaspis angusticeps* (Elapidae). // *J. Venom Res. Library Publishing Media*, 2014. Vol. 5. P. 16–21.
263. Wei J.F. et al. Purification, characterization and biological activities of the l-amino acid oxidase from *Bungarus fasciatus* snake venom // *Toxicon*. *Toxicon*, 2009. Vol. 54, № 3. P. 262–271.
264. Kim J.-O. et al. Lysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 by a Specific Secreted Human Phospholipase A2 // *J. Virol. American Society for Microbiology*, 2007. Vol. 81, № 3. P. 1444–1450.
265. Drayton H.A. Inactivation of Rous virus by phospholipase A // *Nature*. John Wiley and Sons, Inc, 1961. Vol. 192, № 4805. P. 896.
266. Mitsuishi M. et al. Group V and X secretory phospholipase A2 prevents adenoviral infection in mammalian cells // *Biochem. J. Biochem J*, 2006. Vol. 393, № 1. P. 97–106.
267. Kohn A., Klibansky C. Studies on the inactivation of cell-fusing property of newcastle disease virus by phospholipase A // *Virology*. *Virology*, 1967. Vol.

- 31, № 2. P. 385–388.
268. Kruse R.L. Therapeutic strategies in an outbreak scenario to treat the novel coronavirus originating in Wuhan, China // *F1000Research*. NLM (Medline), 2020. Vol. 9. P. 72.
269. Kumar M., Al Khodor S. Pathophysiology and treatment strategies for COVID-19 // *Journal of Translational Medicine*. BioMed Central Ltd, 2020. Vol. 18, № 1. P. 353.
270. Muller V.D. et al. Phospholipase A2 isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus* inactivates dengue virus and other enveloped viruses by disrupting the viral envelope // *PLoS One*. Public Library of Science, 2014. Vol. 9, № 11.
271. Callens N. et al. Morphology and Molecular Composition of Purified Bovine Viral Diarrhea Virus Envelope // *PLOS Pathog.* / ed. Kuhn R.J. Public Library of Science, 2016. Vol. 12, № 3. P. e1005476.
272. Lenard J. Viral Membranes // *Encyclopedia of Virology*. Elsevier Ltd, 2008. P. 308–314.
273. Lorizate M., Kräusslich H.G. Role of lipids in virus replication // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011. Vol. 3, № 10. P. 1–20.
274. Vogel S.S., Leikina E.A., Chernomordik L. V. Lysophosphatidylcholine reversibly arrests exocytosis and viral fusion at a stage between triggering and membrane merger // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268, № 34. P. 25764–25768.
275. Gunther-Ausborn S., Praetor A., Stegmann T. Inhibition of influenza-induced membrane fusion by lysophosphatidylcholine // *J. Biol. Chem.* *J Biol Chem*, 1995. Vol. 270, № 49. P. 29279–29285.
276. Günther-Ausborn S., Stegmann T. How lysophosphatidylcholine inhibits

- cell-cell fusion mediated by the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus // *Virology*. Academic Press Inc., 1997. Vol. 235, № 2. P. 201–208.
277. Yan B. et al. Characterization of the lipidomic profile of human coronavirus-infected cells: Implications for lipid metabolism remodeling upon coronavirus replication // *Viruses*. MDPI AG, 2019. Vol. 11, № 1.
278. Walls A.C. et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein // *Cell*. Cell Press, 2020. Vol. 181, № 2. P. 281-292.e6.
279. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Pöhlmann S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells // *Mol. Cell*. Cell Press, 2020. Vol. 78, № 4. P. 779-784.e5.
280. Xia S. et al. A pan-coronavirus fusion inhibitor targeting the HR1 domain of human coronavirus spike // *Sci. Adv.* American Association for the Advancement of Science, 2019. Vol. 5, № 4.
281. Li C. et al. Phage randomization in a charybdotoxin scaffold leads to CD4-mimetic recognition motifs that bind HIV-1 envelope through non-aromatic sequences // *J. Pept. Res.* John Wiley & Sons, Ltd, 2001. Vol. 57, № 6. P. 507–518.
282. Fenard D. et al. Secreted phospholipases A2, a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells // *J. Clin. Invest.* The American Society for Clinical Investigation, 1999. Vol. 104, № 5. P. 611–618.
283. Maurin T. et al. An Envelope-determined Endocytic Route of Viral Entry Allows HIV-1 to Escape from Secreted Phospholipase A2 Entry Blockade // *J. Mol. Biol.* Academic Press, 2007. Vol. 367, № 3. P. 702–714.
284. de Paula R. et al. Structural and Pharmacological Features of Phospholipases A2 from Snake Venoms // *Protein Pept. Lett.* Bentham Science Publishers Ltd., 2009. Vol. 16, № 8. P. 899–907.

285. Fenard D. et al. A peptide derived from bee venom-secreted phospholipase A2 inhibits replication of T-cell tropic HIV-1 strains via interaction with the CXCR4 chemokine receptor // *Mol. Pharmacol. American Society for Pharmacology and Experimental Therapy*, 2001. Vol. 60, № 2. P. 341–347.