

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.151.01  
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО  
УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ  
АКАДЕМИИ НАУК  
ПО ДИССЕРТАЦИИ **ШЕКУНОВА ЕГОРА ВЯЧЕСЛАВОВИЧА**  
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № \_\_\_\_\_

Решение Диссертационного совета от 16 июня 2023 года

протокол № 282/460

о присуждении **ШЕКУНОВУ ЕГОРУ ВЯЧЕСЛАВОВИЧУ** (Россия) ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация **«ИНГИБИТОРЫ СЛИЯНИЯ БЕТА-КОРОНАВИРУСОВ, ОБЛАДАЮЩИЕ ЛИПИДОПОСРЕДОВАННЫМ ДЕЙСТВИЕМ»**

по специальности 1.5.3. – «Молекулярная биология»

**принята к защите** 17.03.2023 г. (протокол № 277/455)

Диссертационным советом 24.1.151.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук, адрес: 194064 Россия, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4, утвержден приказом Минобрнауки РФ № 105/нк от 11.04.2012 г. Частичные изменения Совета утверждены Приказом № 731/нк от 05.11.2013 г.; частичные изм. Совета утверждены Приказом №155/нк от 09.02.2018; частичные изм. Совета утверждены Приказом №851/нк от 24.09.2019.

**Шекунов Егор Вячеславович**, 1995 г.р., в 2018 г. – закончил магистратуру факультета естественных наук Новосибирского национального исследовательского государственного университета. В 2018 г. поступил в очную аспирантуру Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и

трансляционной медицины». Далее в октябре 2019 г. перевелся в очную аспирантуру Института цитологии РАН, где и продолжил дальнейшее обучение. С января 2020 г. по настоящее время Е.В. Шекунов является младшим научным сотрудником Лаборатории моделирования мембран и ионных каналов Отдела физиологии клетки.

**Диссертация выполнена** в Лаборатории моделирования мембран и ионных каналов Института цитологии РАН.

**Научный руководитель:**

**Остроумова Ольга Сергеевна**, доктор биологических наук, главный научный сотрудник с возложением обязанностей заведующей Лабораторией моделирования мембран и ионных каналов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии РАН

**Официальные оппоненты:**

1. **Васин Андрей Владимирович**, доктор биологических наук, профессор РАН, директор Института биомедицинских систем и биотехнологий Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого.
2. **Башкиров Павел Викторович**, кандидат физико-математических наук, заведующий Лабораторией биоэлектрохимии «Научно-исследовательского института системной биологии и медицины» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

**Дали положительные отзывы на диссертацию.**

**Ведущая организация:**

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук, г. Москва. В заключении (было подготовлено ведущим научным сотрудником Лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений, доктором химических наук Хандажинской Анастасией Львовной и утверждено заместителем директора

ФГБУН ИМБ РАН, доктором биологических наук, Ивановым Александром Владимировичем) указано, что диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции от 11.09.2021), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – «Молекулярная биология», **и дан положительный отзыв на диссертацию.**

Соискатель имеет 8 опубликованных работ по теме диссертации, из них 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций, и 5 тезисов докладов.

**Наиболее значимые работы по теме диссертации:**

1. **Shekunov E. V.**, Efimova S. S., Yudintceva N. M., Muryleva A. A., Zarubaev V. V., Slita A. V., Ostroumova, O. S. Plant alkaloids inhibit membrane fusion mediated by calcium and fragments of MERS-CoV and SARS-CoV/SARS-CoV-2 fusion peptides // *Biomedicines*. – 2021. – Т. 9. – №. 10. – С. 1434. doi: 10.3390/biomedicines9101434.

В работе исследована способность двадцати соединений алкалоидного ряда ингибировать кальций-опосредованное слияние мембран. Анализ полученных экспериментальных данных выявил, что пиперин, таберсонин, горденин, люпинин, хинин и 3-изобутил- $\beta$ -метилксантин значительно подавляют кальций-индуцированное слияние мембран. В свою очередь, пиперин и таберсонин подавляли пептид-ассоциированное слияние. Изучено влияние протестированных алкалоидов на физические свойства мембран. Установлено, что антифузогенный эффект алкалоидов зависит от способности соединений снижать кооперативность фазового перехода липидов и липидного состава мембраны. Пиперин снижает титр потомства SARS-CoV-2 *in vitro*.

2. Ефимова С. С., Злодеева П. Д., **Шекунов Е. В.**, Остроумова О. С. Механизмы ингибирования слияния липидных везикул экстрактами чаги и листьев облепихи // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. – 2022. – Т. 39. – №. 5. – С. 335-363. doi: 10.31857/S0233475522050048.

В работе оценена способность экстрактов семян грейпфрута, листьев облепихи и чаги ингибировать кальций- и ПЭГ-ассоциированное слияние мембран. Проведена оценка влияния на слияние везикул некоторых мажорных компонентов тестируемых экстрактов. Изучено влияние протестированных полифенолов на физические свойства мембран. Выявлена корреляция между параметрами, характеризующими термотропное поведение липидов в присутствии кверцетина, мирицетина, рутина, бетулина, люпеола и индексом ингибирования соединений.

3. **Shekunov E.V.**, Zlodeeva P.D., Ostroumova O.S., Efimova S.S. The degree of hydroxylation of phenolic rings determines the ability of flavonoids and stilbenes to inhibit calcium-mediated membrane fusion // Nutrients. – 2023. – Т. 15. – №. 5. – С. 1121. doi: 10.3390/nu15051121.

Статья посвящена обсуждению возможности использования растительных полифенолов в качестве ингибиторов слияния мембран. Установлено, что полифенолы, содержащие по меньшей мере две ОН-группы в обоих фенольных кольцах, в частности пицеатаннол, катехин и таксифолин были способны ингибировать кальций-опосредованное слияние мембран. Кроме того, выявлена корреляция между способностью тестируемых соединений разупорядочивать мембранообразующие липиды и подавлять слияние мембран.

**На диссертацию и автореферат поступили отзывы:**

1) Заведующего лабораторией молекулярного дизайна и синтеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.

Овчинникова РАН, доктора химических наук, Коршуна Владимира Аркадьевича. Отзыв положительный, имеются вопросы и замечания.

«... 1. В табл. 2 (с. 10), 5 (с.16) и 7 (с.18) имеются столбцы «химическая структура», в которых изображены раскрашенные шаростержневые модели исследованных молекул. Такие изображения позволяют визуально оценить форму молекулы и распределение гидрофильных и гидрофобных элементов, но по ним затруднительно найти «бензольные кольца А и Б»

2. Автореферат выиграл бы от добавления рисунка, который схематически отражал бы предполагаемый механизм ингибирующего действия изученных соединений а отношении заражения «хозяйской» клетки вирионами...».

2) Научного сотрудника лаборатории «OpenLab: Генные и клеточные технологии» Института фундаментальной медицины и биологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Казанского (Приволжского) государственного университета, кандидата биологических наук, Чулпановой Дарьи Сергеевны. Отзыв положительный, имеются вопросы и замечания.

«...1. Используются ли ингибиторы слияния с подобным механизмом действия в современной клинической практике?

2. Как изменяются эластические свойства бислоя при взаимодействии с вирусными пептидами слияния? Какую роль при этом играет липидный состав мембраны?...»

3) Старшего научного сотрудника отдела молекулярной генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института экспериментальной медицины, кандидата биологических наук, Ильичевой Екатерины Юрьевны. Отзыв положительный, без замечаний.

4) Заведующего лабораторией экспериментальной онкологии и испытания фармакологических средств научно-исследовательского Института вирусологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины, кандидата биологических наук, Юрченко Ксении Сергеевны. Отзыв положительный, имеются вопросы и замечания.

«... 1. Проводилась ли работа по оценке изменений исследуемых параметров – в частности изменение граничных потенциалов и анализа цитопатического действия вируса в присутствии метаболитов в динамике эксперимента? Этих данных нет в работе, а между тем динамические изменения могли бы продемонстрировать наглядно молекулярные механизмы действия метаболитов и подтвердить наличие противовирусной активности. Например, в случае с оценкой титров вируса на клеточной культуре Vero большую роль играет временная точка, выбранная для анализа – в данной работе это 72 часа – действительно среднее время после инфицирования, необходимое для реализации цитотоксического действия многих типов вирусов. Однако картина может очень сильно меняться в зависимости от суток наблюдения, вирусной нагрузки – результаты динамики вирусного титра и жизнеспособности клеток с первых до (как минимум) шестых суток после инфицирования была бы более информативной.

2. Для анализа противовирусной активности тестируемых соединений на перевиваемой клеточной культуре Vero использовали изолят 17612 SARS-CoV-2. В тексте автореферата не уточняется, откуда получен этот изолят и охарактеризован ли он по вирусологическим параметрам. Депонирован ли как штамм (в таком случае указывается номер и место депонирования)?

3. К вопросу из пункта 2 – к какому варианту относится изолят (Альфа, Бета, Гамма, Дельта и Омикрон)? Было бы интересным и наглядным, если бы анализ противовирусной активности исследуемых метаболитов был проведен с инфицированием клеток Vero (или даже разных клеточных линий) разными вариантами штаммов SARS-CoV-2, чтобы

продемонстрировать универсальность исследуемой антифузогенной активности метаболитов.

4. Титр вируса в тексте автореферата в материалах и методах указан некорректно – нужно уточнить на какой объем проходится  $10^3$  ТЦД50. Возможно в тексте автореферата это опечатка, так как в результатах титр указан с уточнением объема.

5. Как по мнению автора возможно применять лекарственный препарат на основе растительных метаболитов для использования в медицинских целях. Если опираться на результаты противовирусной активности – то имеет место исключительно профилактический эффект применения метаболитов. Как правило, оболочечные белки коронавирусов активно связываются с рецептором (ACE2 для штаммов новой коронавирусной инфекции) на поверхности клетки-хозяина, которые присутствуют не только в легких, но и ЖКТ, почках, печени, опосредуя слияние вирусной капсулы и клеточной мембраны для завершения инфильтрации. Применение метаболитов может помешать слиянию мембран на этой стадии. Однако, как только SARS-CoV-2 проникает в клетки, он может вызвать иммунную каскадную реакцию. В ответ на инфицирование вирусом развивается иммунный ответ организма, во время которого происходит активация различных клеточных сигналов, высвобождение большого количества факторов воспаления, и, затем, цитокиновый шторм. Однако неконтролируемая воспалительная реакция и иммунные нарушения могут вызвать мультиорганное иммунное патологическое повреждение. Собственно многочисленные осложнения в таком случае связаны уже не с проникновением вируса в клетки – насколько препарат уже на стадии развития инфекции может быть эффективен?...»

**В дискуссии принимали участие:**

1. д.б.н. Казначеева Елена Валентиновна, член Диссертационного совета;
2. д.б.н., проф. Корнилова Елена Сергеевна, председатель Диссертационного совета;

3. д.б.н., Морачевская Елена Алексеевна, член Диссертационного совета.

**Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается** высокой квалификацией выбранных специалистов в области изучения мембран и молекулярной вирусологии, для более объективной оценки результатов, представленных в диссертации.

**Диссертационный совет отмечает, что на основании** выполненных соискателем исследований:

**разработан** инновационный методический подход для поиска соединений, способных подавлять слияние мембран под действием различных индукторов;

**предложена** концепция разработки новых противовирусных препаратов;

**доказано**, что степень гидроксирования бензольных колец, фланкирующих молекулу растительных полифенолов, и длина жирнокислотного остатка в молекулах циклических липопептидов определяют ингибирующую активность в отношении слияния мембран. Доказана противовирусная активность пиперина, акулеацина А, анидулафунгина, итурина А и микосубтилина в отношении SARS-CoV-2;

**введена и верифицирована** тест-система, имитирующая слияние  $\beta$ -коронавирусов с клеткой, которая базируется на слиянии моноламеллярных липосом под действием фрагментов пептидов слияния SARS-CoV/SARS-CoV-2 и MERS-CoV, и позволяет оценить антифузогенный потенциал различных соединений.

**Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:**

**доказано**, что изменение упругих свойств мембраны под действием экзогенных соединений определяет их способность подавлять слияние мембран;

**применительно к проблематике диссертации** в работе был использован широкий спектр прецизионных методов молекулярной и клеточной биологии, включая флуориметрию утечки кальцеина, оценку изменения граничного потенциала, измерение гидродинамического диаметра везикул,



дифференциальную сканирующую микрокалориметрию, конфокальную флуоресцентную микроскопию и анализ противовирусной активности соединений *in vitro*. В работе использовали плоские липидные бислои, малые и гигантские моноламеллярные липосомы, а также клеточная линия *Vero* (ATCC CCL81) и изолят 17612 вируса SARS-CoV-2;

**изложены** доказательства в пользу регуляции слияния мембран путем модификации их физических свойств вторичными метаболитами;

**раскрыты** структурные мотивы в молекулах растительных полифенолов и циклических липопептидов, определяющие способность этих соединений ингибировать слияние мембран;

**изучено** влияние вторичных метаболитов на физические свойства липидного матрикса, детерминирующие слияние мембран;

**проведена** модернизация представлений о возможностях регуляции вирус-опосредованного слияния мембран экзогенными соединениями.

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:**

**разработан и внедрен** новый подход для оценки способности соединений подавлять слияние мембран и, тем самым, оказывать противовирусное действие;

**определен** перечень ингибиторов слияния мембран, индуцированного различными индукторами, в том числе, катионами кальция, полиэтиленгликолем с высокой молекулярной массой и фрагментами пептидов слияния различных вирусов семейства *Coronaviridae*;

**создана** тест-система, имитирующая слияние вирусных частиц с клеткой, позволяющая осуществлять первичный скрининг соединений с потенциальной противовирусной активностью;

**представлены** предложения для изыскания новых противовирусных агентов с липидопосредованным механизмом действия и перепрофилированию существующих лекарственных препаратов.

**Оценка достоверности результатов исследования выявила:**

**при проведении экспериментов** автором использовано сертифицированное оборудование и коммерчески доступные материалы. Выбор применяемых методов адекватен, обусловлен спецификой исследования и соответствует поставленным в работе задачам. Показана воспроизводимость результатов исследования;

**теория** базируются на общепринятых и проверяемых данных и полностью согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации и по смежным отраслям, полученными независимыми источниками;

**идея базируется** на обобщении и анализе литературных и полученных экспериментальных данных;

**использованы** адекватные и современные методики сбора и обработки исходной информации;

**установлено** качественное и, в некоторых случаях, количественное совпадение авторских результатов с данными, представленными в независимых источниках по тематике исследования, в тех случаях, когда такое сравнение является обоснованным.

**Личный вклад соискателя состоит в:**

планировании и проведении экспериментальных исследований, анализе и интерпретации полученных результатов, проверке их достоверности, подготовке и написании публикаций по выполненной работе. Основные результаты исследования получены лично автором или при его непосредственном участии. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

Диссертация, посвященная поиску вторичных метаболитов растений и микроорганизмов, обладающих способностью ингибировать слияние мембран под действием различных индукторов, включая фрагменты вирусных пептидов слияния, и выявлению молекулярных механизмов их активности. Работа является комплексным и законченным (в рамках поставленных задач) научно-квалификационным исследованием в области

молекулярной биологии. Работа имеет большое значение с фундаментальной точки зрения, поскольку раскрывает молекулярные механизмы подавления слияния мембран экзогенными соединениями и описывает ключевые структурные особенности потенциальных ингибиторов слияния. Кроме того, созданный экспериментальный задел является основой для дальнейшего скрининга соединений с противовирусной активностью такого типа. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных Е.В. Шекуновым работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации. Диссертационная работа полностью соответствует требованиям, установленным в п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 (в действующей редакции от 11 сентября 2021 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – «Молекулярная биология».

В ходе защиты диссертации были высказаны критические замечания и вопросы дискуссионного характера, касающиеся возможности применения метода флуориметрии утечки кальцеина из липосом для оценки слияния мембран и механизмов действия, лежащего в основе антифузогенной активности тестируемых соединений.

Соискатель Шекунов Е.В. ответил на все задаваемые ему в ходе заседания вопросы, согласился с замечаниями и привел собственную аргументацию возможности утечки красителя при слиянии липидных везикул, а также обосновал, что способность тестируемых соединений индуцировать положительную спонтанную кривизну в монослое является основополагающей для проявления ими антифузогенной активности.

На заседании 16 июня 2023 г. Диссертационный совет 24.1.151.01 принял решение за вклад в развитие альтернативной противовирусной стратегии, базирующейся на использовании ингибиторов слияния вирусов с липидопосредованным механизмом действия и решение научной задачи в области молекулярной биологии **присудить Шекунову Егору**

**Вячеславовичу** ученую степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – «Молекулярная биология».

При проведении тайного голосования Диссертационный совет в количестве 20 человек (из них 9 докторов по специальности рассматриваемой диссертации) из **25** человек, входящих в состав Диссертационного совета, проголосовали:

**«ЗА» - 20, «ПРОТИВ» - нет.**

Председатель заседания:  
председатель  
Диссертационного совета 24.1.151.01  
доктор биологических наук, профессор



Е.С. Корнилова

Ученый секретарь  
Диссертационного совета 24.1.151.01  
доктор биологических наук

М.Г. Мартынова

«19» июня 2023 г.