

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу Галочкиной Анастасии Валерьевны

ПРОТИВОВИРУСНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ АНТИОКСИДАНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КОКСАКИВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У МЫШЕЙ,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «03.02.02 – вирусология»

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ

Вирусы Коксаки – одни из наиболее распространенных патогенов человека, вызывающие различные заболевания с многообразным диапазоном тяжести. Во многих случаях это заболевания с гриппоподобными симптомами, которые не требуют лечения, однако в ряде случаев вирусы Коксаки вызывают более серьезные инфекции, приводящие к энцефалитам и миокардитам. Хотя достигнуты определенные успехи в разработке этиотропных препаратов для лечения инфекций, вызванных некоторыми вирусами Коксаки (- например плеконарил, пиродавир), к настоящему времени лицензированные препараты данной группы на рынке отсутствуют. Следует отметить, что в последние годы наблюдается бум в разработке препаратов против вирусных инфекций. Если прошлый век назывался веком антибиотиков, то настоящий век по праву можно назвать веком противовирусных препаратов. Анализ терапевтических направлений новых лекарственных средств показал, что исследования, направленные на создание новых лекарственных средств для лечения различных инфекционных болезней занимают второе место после онкологических препаратов и составляют 14%, от всех разрабатываемых препаратов. К наиболее впечатляющим успехам химиотерапии вирусных инфекций безусловно можно отнести разработку комбинированной терапии ВИЧ инфекции, превратившей ее из смертельной болезни в хроническую при условии постоянного приема препаратов. Другим достижением является открытие и внедрение в практику этиотропной терапии против гепатита С, результатом которой является элиминация вируса в организме. Известно, что в некоторых случаях высокая эффективность, широта спектра действия и безопасность противовирусного препарата обусловлена разнообразием биологической активности молекулы, включающей помимо противовирусной активности другие свойства. Именно к таким молекулам относятся флавоноиды растительного происхождения, в частности дигидрокверцетин (ДКВ). Препараты такого рода

рассматриваются в качестве перспективных и изучение их является приоритетным направлением ряда фармацевтических компаний.

В связи с вышесказанным актуальность диссертационной работы А.В. Галочкиной, посвященной оценке терапевтического потенциала антиоксидантов растительного происхождения при лечении экспериментальной коксакивирусной инфекции не вызывает сомнений и соответствует современной постановке задачи.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА РАБОТЫ

В данной работе впервые разработана и охарактеризована экспериментальная модель на беспородных мышах для изучения патогенеза вирусного панкреатита, вызванного вирусом Коксаки В4, на которой оценена эффективность антиоксидантных соединений растительного происхождения. Впервые показана противовирусная активность ДКВ в отношении вируса Коксаки В4 *in vitro* и *in vivo* и предложены возможные механизмы действия антиоксидантов как противовирусных веществ в отношении этого вируса.

ЗНАЧЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ДЛЯ НАУКИ И ПРАКТИКИ

Понимание основных механизмов противовирусной активности антиоксидантов создает теоретическую основу для возможности оценки перспективы создания комплексных противовирусных средств для лечения КВИ. Поиск новых активных соединений в отношении вируса Коксаки В4, создание экспериментальной животной модели для оценки их эффективности и изучения патогенеза вируса Коксаки В4 в ней определяют практическую значимость диссертационной работы.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ.

Диссертация изложена на 113 страницах машинописного текста и построена по традиционному плану- состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (материалы и методы, результаты исследования), обсуждения полученных результатов, выводов, списка литературы. Работа иллюстрирована 20 таблицами и 51 рисунком. Библиографический справочник включает 120 источников, из которых 9 и 111 на русском и иностранных языках соответственно.

Во введении отмечена актуальность темы, поставлены цели и задачи исследования, отражены научная новизна, положения, выносимые на защиту, а также научно-практическая значимость работы

Обзор литературы легко читается, достаточно полно освещает практически все проблемы, затронутые в диссертации. Но, на мой взгляд, обзор литературы выглядел бы более завершенным, если бы автор вкратце резюмировал данные литературы по теме диссертации в виде заключения и сформулировал бы обоснованность проведения новых исследований в этой области.

Раздел собственных исследований традиционно начинается с описания Материалов и методов, используемых при выполнении работы. Подробно излагаются разнообразные вирусологические, иммунологические и молекулярно-биологические методы, примененные в работе.

Центральной частью работы являются полученные диссертантом Собственные результаты исследования, которые условно можно разделить на несколько частей. Первая часть собственных исследований посвящена исследованию антиоксидантной и противовирусной активности ряда флавоноидов в отношении вируса Коксаки В4, для чего был использован традиционный классический подход медицинской химии, доказавший свою состоятельность во многих исследованиях, так называемые исследования структура- активность. Из ряда изученных антиоксидантов только ДКВ показал противовирусную защиту в отношении вируса Коксаки В4 в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Следующая часть собственных результатов исследования посвящена определению механизма действия ДКВ. Показано отсутствие у него вирулицидного действия, серия опытов по временным интервалам добавления флавоноида позволила предположить его эффект на ранние стадии вирусной репродукции. В дальнейших опытах автором была предпринята попытка получить резистентные к ДКВ мутанты, однако после 5 пассажей в присутствии 100 мкг/мл соединения их не удалось типировать фенотипически. Важнейшей частью работы явилось выявление в разработанной модели экспериментальной коксакивирусной инфекции на белых беспородных мышях эффективности ДКВ, выражающейся в снижении вирусных титров в поджелудочной железе, повышении уровня антиоксидантной защиты, нормализации морфологической структуры ткани поджелудочной железы и угнетении формирования вирусспецифических структур в клетке.

В разделе Обсуждение автор обсуждает полученные данные и оценивает их с позиций мирового научного опыта, полностью отражает результаты исследования, вытекающие из них выводы и практические рекомендации, обобщая проделанную работу.

Выводы из выполненной работы соответствуют поставленным задачам, подводят итог проведенным исследованиям и достаточно полно отражают результаты, полученные автором.

Полученные результаты и сделанные на их основании выводы базируются на анализе статистически значимого количества материала. Достоверность результатов работы подтверждается как экспериментальными данными, так и использованием современных средств и методик проведения исследований.

Основные результаты и положения диссертации, выводы и заключение полностью отражены в 4 печатных работах, 3 из которых опубликованы в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки РФ. Научные достижения автора были представлены на 2 международных и российских научных конференциях. Автореферат соответствует основному содержанию диссертации.

ВОПРОСЫ И ЗАМЕЧАНИЯ ПО ДИССЕРТАЦИИ

В рецензируемой диссертационной работе не выявлены существенные недостатки. В качестве отдельных замечаний по оформлению, а также вопросов можно отметить следующие:

1. В работе имеются некоторые неточности и опечатки, например, в автореферате имеются повторения как отдельных слов (стр.4), так и фраз (стр.13), опечатки стр.65 и 91 (строчка 9 сверху) диссертации, небрежности в некоторых случаях при перечислении пунктов между цифрами и названием пункта есть точки, в некоторых нет и т.д.
2. В разделе Собственные исследования много описаний методик, которые более логично разместить в разделе Материалы и Методы
3. В разделе Обсуждение много повторов из раздела Литературный обзор, или например информация по разработке генно-инженерных препаратов для борьбы с инфекциями, вызванными вирусами Коксаки, что никак не относится к предмету исследования и может быть описано кратко в Литературном обзоре. Обсуждение, на мой взгляд, могло бы быть более кратким по содержанию, но более емким по смыслу
4. На страницах 55 и 67 при множественности заражения указаны только цифры, не указаны единицы заражения - сколько это будет в ТЦИД50
5. В Материалах и методах не указано, каким образом определяли противовирусную активность ДКВ в отношении вируса гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (для данных представленных в Таблице 10)

6. Неточно сформулирован вывод 5 - вместо слова "повышение" правильное использовать слово "возникновение"

В качестве вопросов по диссертационной работе задать следующие:

1. Как соотносятся данные значения ЕК50 ингибирования антиоксидантной активности ДКВ со значениями ЕК50 при ингибировании вирусной репликации ДКВ, поскольку они представлены в диссертации в разных единицах (мкМ и мкг/мл), логично представить все в одинаковых единицах, так их легче было бы сравнить?
2. При изучении зависимости эффекта ДКВ на вирусную репродукцию от сроков его добавления к клеткам не были использованы препараты сравнения, например рибавирин(ингибитор синтеза) или соединения класса WIN (ингибитор связывания вируса с клеточным рецептором). Есть ли подобные временные данные в литературе для этих соединений, если да, то какие? Как Вы предполагаете, какой белок может быть мишенью ДКВ?
3. Вам не удалось получить мутанты, резистентные к ДКВ, путем пассирования вируса в культуре клеток. Не оценивали ли Вы риск возникновения резистентности у мышей, проверив чувствительность вируса, которым проводили заражение и вируса, выделенного у животных после курса приема ДКВ?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом можно констатировать, что представленная А.В. Галочкиной диссертация является законченной научно-исследовательской работой, содержащей решение актуальной научной задачи- оценке терапевтического потенциала антиоксидантов растительного происхождения при лечении экспериментальной коксакивирусной инфекции. Диссертация полностью соответствует паспорту заявленной научной специальности «03.02.02 – вирусология»

А.В. Галочкина выполнила большой объем экспериментальной работы с использованием современных вирусологических, иммунологических, молекулярно-биологических и гистологических методов. В диссертации представлены обоснованные научные положения и выводы, вытекающие из результатов проведенных многосторонних исследований. Диссертационная работа *Галочкиной Анастасии Валерьевны* **ПРОТИВОВИРУСНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ АНТИОКСИДАНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КОКСАКИВИРУСНОЙ**

ИНФЕКЦИИ У МЫШЕЙ, по актуальности, новизне, научно-практической значимости несомненно отвечает требованиям п.9-11 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук.

А.В. Галочкина заслуживает присуждения ей искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – «вирусология».

Заведующая лабораторией

экспериментальной вирусологии ФГБУ НИИВС им. Мечникова РАМН

доктор биологических наук

 И.А.Ленева

Подпись заведующей лабораторией

экспериментальной вирусологии

ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова И.А. Леновой заверяю.

Ученый секретарь

ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова

кандидат биологических наук



Андропова Н.И.

3 февраля 2017 г.

Ленёва Ирина Анатольевна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией экспериментальной вирусологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»

Раб. тел. (+7)-495-917-49-00

Россия 105064, Москва, Малый Казенный переулок, д.5а

wnyfd385@yandex.ru