

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»

Ларионовой Натальи Валентиновны

на диссертационную работу Федоровой Виктории Александровны

«Изучение противовирусной активности синтетических производных цитизина в

отношении вирусов гриппа и парагриппа»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук

по специальности 03.02.02 – Вирусология

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.

Диссертация Виктории Александровны Федоровой, выполненная под руководством д.б.н. Владимира Викторовича Зарубаева, посвящена поиску и характеристике препаратов, обладающих химиотерапевтической активностью против возбудителей респираторных инфекций человека, вызванных вирусами гриппа и парагриппа, среди синтетических производных цитизина.

Актуальность исследования не подлежит сомнению, поскольку направлена на решение серьезной проблемы здравоохранения, связанной с эффективностью лечения массовых вирусных заболеваний человека, вызванных вирусами гриппа А и В и парагриппа 3 типа. Количество эффективных препаратов против гриппа, способного вызывать тяжелые инфекции верхних и нижних дыхательных путей, массовые эпидемии и пандемии, невелико, к тому же вирусы быстро вырабатывают резистентность к применяемым химиопрепаратам, поэтому в арсенале эффективных средств должен сохраняться резерв.

Что касается парагриппозной инфекции, в частности вызванной вирусом парагриппа человека 3 типа, от нее страдают все возрастные группы населения, но в большей степени маленькие дети, у которых нередко заболевания протекают с сильной интоксикацией, поражением нижних отделов респираторного тракта и осложнениями, а разрешенных к применению химиопрепаратов нет.

Кроме того, очень привлекательной является направленность на поиск препаратов широкого спектра действия, эффективных при разных респираторных вирусных инфекциях, поскольку в практике здравоохранения их зачастую сложно дифференцировать без использования методов лабораторной диагностики.

ПОСТРОЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ. Работа построена по традиционной схеме и состоит из «Введения», «Обзора литературы», описания «Материалов и методов», «Результатов исследований», «Обсуждения», «Заключения», «Выводов» и «Списка литературы». Диссертация изложена на 126 страницах машинописного текста, иллюстрирована 23 таблицами и 29 рисунками. Список литературы включает 186 цитируемых источников, преимущественно опубликованных в англоязычных изданиях.

Диссертация изложена хорошим грамотным языком, с интересом читается. Во введении отмечена актуальность темы, поставлены цели и задачи исследования, отражены научная новизна, положения, выносимые на защиту, а также научная и практическая значимость работы. Обзор литературы состоит из трех глав, полно освещает проблемы, разрабатываемые в исследовании. Результаты исследований соответствуют поставленным цели и задачам работы. В обсуждении проведены подробный анализ проведенных исследований и обобщение полученных результатов.

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

Наряду с основными разделами, в работу включен раздел «Перспективы дальнейшей разработки темы», который намечает план дальнейших исследований с целью отбора из эффективных производных цитизина соединений с широким спектром действия в отношении возбудителей респираторных заболеваний человека, таких как респираторно-синцитиальный вирус, коронавирусы, рино- и аденовирусы, определением мишени антивирусного действия перспективных препаратов.

СТЕПЕНЬ ОБОСНОВАННОСТИ И ДОСТОВЕРНОСТИ НАУЧНЫХ ПОЛОЖЕНИЙ, ВЫВОДОВ И РЕКОМЕНДАЦИЙ, СФОРМУЛИРОВАННЫХ В ДИССЕРТАЦИИ. Достоверность и объективность выносимых на защиту положений и выводов диссертации подтверждается исследованиями производных цитизина с использованием широкого набора методик: вирусологических, биохимических, иммунологических, морфологических, электронномикроскопических. Исследования включали проверку цитотоксичности препаратов, их эффективности против вирусов гриппа и парагриппа 3 типа *in vitro* в культурах клеток и *in vivo* на модели летальной гриппозной пневмонии у белых мышей, поиск мишени действия препаратов в инфицированных культурах клеток, исследование способности вирусов гриппа и

парагриппа к формированию ингибиторорезистентности к производным цитизина, а также статистическую обработку результатов.

Материалы диссертационного исследования достаточно полно представлены в 8 опубликованных научных работах, включающих 2 статьи в российских журналах, входящих в перечень, рекомендованный ВАК, 3 - в других изданиях, 2 из которых - в зарубежных журналах, индексированных в международных библиографических базах (SCOPUS, PubMed) и в сборниках материалов 3 конференций.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА РАБОТЫ В.А. Федоровой заключается в следующем: впервые исследована противовирусная эффективность синтетических производных разрешенного к применению в медицине низкотоксичного растительного алкалоида цитизина. Лекарственная форма цитизина эффективна в борьбе с табакозависимостью, его используют в качестве дыхательного аналептика при рефлекторных остановках дыхания; при угнетении дыхания и кровообращения у больных с инфекционными заболеваниями, при шоковых и коллаптоидных состояниях. Гипотеза об активности цитизина в отношении респираторных вирусов человека - вирусов гриппа и парагриппа - до сих пор в научных публикациях не высказывалась.

Автором исследовано девять групп препаратов с различной базовой структурой, включающих 84 синтетических производных цитизина, в отношении вирусов гриппа А (H1N1, H1N1pdm09, H3N2, H5N2) и В (линий Ямагата и Виктория) и вируса парагриппа человека 3 типа. Впервые среди производных цитизина были выявлены *in vitro* 24 соединения, обладающие противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа и 29 соединений, активных в отношении вируса парагриппа человека 3 типа.

Проведен анализ противовирусной активности синтетических производных цитизина, связанной со вкладом различных боковых заместителей в молекуле (-)-цитизина.

Выявлены несколько соединений, обладающих перекрестной эффективностью в отношении исследованных вирусов гриппа А и В и парагриппа человека 3 типа.

Показано, что соединения, лидеры по низкой токсичности и противовирусной эффективности *in vitro*, обладали также умеренной противогриппозной активностью *in vivo*.

Продемонстрировано, что производные цитизина проявляют максимальную противовирусную активность на поздних стадиях репродукции вируса гриппа, по полученным данным связанную с угнетением вирус-индуцированного синтеза клеточных компонентов F-актина и тубулина, которые вовлечены в транспорт вирусных белков к месту сборки вирионов.

Проверено, что исследованные вирусы гриппа и парагриппа 3 типа не имеют тенденции к выработке резистентности к производным цитизина после пяти последовательных пассажей в культурах клеток.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ заключается в доказательстве перспективности синтетических производных цитидина как потенциальных противовирусных препаратов. Установленная противовирусная эффективность производных цитизина в отношении вирусов гриппа и парагриппа *in vitro*, умеренный противогриппозный эффект соединений-лидеров *in vivo* дают основания для продолжения поиска активных противовирусных препаратов среди производных цитизина.

В ПРОЦЕССЕ ОЗНАКОМЛЕНИЯ С ТЕКСТОМ ДИССЕРТАЦИИ ВОЗНИКЛИ СЛЕДУЮЩИЕ ЗАМЕЧАНИЯ:

В диссертационном исследовании встречаются нечеткие положения и неточности формулировок.

- Так, на стр. 7 в разделе Основные положения, выносимые на защиту, пункт 1: «Синтетические производные цитизина обладают противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа А подтипов H1N1, H3N2 и H5N2 и вирусов гриппа В линий В/Виктория и В/Ямагата, а также в отношении вируса парагриппа человека 3 типа.» **Не указано, что исследовалась противовирусная активность *in vitro*.** В следующей фразе говорится, что «Соединения-лидеры этой группы проявляют умеренную противогриппозную активность *in vivo*». Без уточнения в первой фразе непонятна вторая.
- В пункте 2 раздела Основные положения также отсутствует уточнение *in vitro*.
- Пункт 2 раздела Основные положения следует разбить на три пункта, либо дать логическую связь для включения трех положений в один пункт.
- Раздел Научная новизна, стр. 6 и 7, следовало бы сформулировать более логично:
Два абзаца:

«Впервые было изучено влияние синтетических производных цитизина на разные стадии репродукции вируса гриппа», и

«Впервые показано что синтетические производные цитизина не проявляют ингибирующую активность в отношении нейраминидазы вируса гриппа А»

имеет смысл объединить в один: «Впервые было изучено влияние синтетических производных цитизина на разные стадии репродукции вируса гриппа. Показано, что синтетические производные цитизина не проявляют ингибирующую активность в

отношении нейраминидазы вируса гриппа А.»

Следующий пункт: «**Впервые изучена возможность селекции штаммов вируса гриппа и ВПГЧЗ, резистентных к синтетическим производным цитизина**» воспринимается, как констатация того, что резистентные к препарату штаммы были получены, хотя подразумевается обратное.

- В подписи к Рисунку 1 «Схема строения вирусов гриппа А, В и С», стр. 13, представлена устаревшая схема строения вируса гриппа, на которой не отражены особенности строения вирусов гриппа В, которые, однако, приведены в тексте. NS2 – устаревшее название (стр. 15). Теперь известно, что это структурный белок NEP. Он также не отмечен на схеме.
- Подпись к Рис. 2 не полностью соответствует содержанию рисунка. Помимо жизненного цикла вируса гриппа, в нем отражен механизм действия противогриппозных препаратов.
- Ни в списке сокращений, ни в разделе Материалы и методы нет объяснения символа «показатель ΔT », он расшифровывается в тексте, стр. 66, как «снижение вирусных титров». Следует также уточнить единицы измерения «вирусных титров».
- В основном, в оформлении диссертационного исследования автор следует нормативам ГОСТ Р 7.0.11-2011. Однако, отсутствуют, требуемые нормативами списки таблиц и рисунков, не приведены литературные ссылки на собственные публикации автора по теме исследования.

Отмеченные замечания незначительны. Они ни в коей мере не умаляют достоинств проведенных исследований и качества представленных результатов.

ПО ДИССЕРТАЦИОННОМУ ИССЛЕДОВАНИЮ ВОЗНИКЛИ СЛЕДУЮЩИЕ ВОПРОСЫ:

1. Автор имеет основания предполагать, что производные цитидина подавляют синтез индуцированных вирусом клеточных белков F-актина и тубулина. Интересует мнение автора: при таком опосредованном, через клетку, воздействии препаратов на вирус можно ли ожидать высокого противовирусного эффекта препаратов? Ведь высокие дозы препарата будут токсичны для клеток – приведут к нарушению цитоскелета, а в нетоксичных дозах препарата синтез клеточных белков будет лишь снижен, что не даст возможности полностью элиминировать вирус из клеток.

2. Исходя из первого вопроса, интересно узнать мнение автора о том, каковыми видятся фармакологические перспективы производных цитидина?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Виктории Александровны Федоровой является законченным этапом научной работы, имеющей существенное значение в качестве теоретического обоснования дальнейших исследований по разработке активных противовирусных соединений широкого спектра действия и для целей практической медицины.

Полученные автором результаты достоверны, выводы и заключения обоснованы. Работа базируется на достаточном числе исходных данных.

Диссертационная работа В.А. Федоровой «Изучение противовирусной активности синтетических производных цитизина в отношении вирусов гриппа и парагриппа» полностью соответствует критериям пункта 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук.

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

Официальный оппонент –
доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
отдела вирусологии ФГБНУ «ИЭМ»,

Н.В. ЛАРИОНОВА

12 января 2021 г.

Подпись *Ларионовой Н.В.*
Удостоверяется
Нач. отдела УП и Д ФГБНУ «ИЭМ» *Кабарова О.В.*