

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор

по научно-исследовательской и
клинической работе федерального
государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации
доктор медицинских наук, профессор

Уфимцева М.А.

2020 г.

ОТЗЫВ

ведущего учреждения о научно-практической значимости диссертационной работы **Федоровой Виктории Александровны** «Изучение противовирусной активности синтетических производных цитизина в отношении вирусов гриппа и парагриппа», на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология, представленной к защите в диссертационный совет Д 001.043.01 при ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А.Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Актуальность темы выполненной работы

Профилактика и лечение гриппа и других респираторных вирусных инфекций остаются в числе приоритетных проблем медицинской науки и практического здравоохранения в связи с огромным ущербом здоровью населения, человеческими жертвами и экономическими потерями от ежегодных эпидемических подъемов заболеваемости и периодически возникающими пандемиями. Несмотря на достаточно большой спектр имеющихся химиотерапевтических противогриппозных препаратов, единственным эффективным методом защиты населения остается вакцинопрофилактика гриппа.

По механизму действия противогриппозные препараты, используемые для лечения и профилактики гриппа, включают ингибиторы нейраминидазы (осельтамивир и занамивир), блокаторы М2 канала (амантадин и ремантадин), ингибиторы РНК-зависимой РНК-полимеразы (фавипиравир), ингибитор кЭП-зависимой эндонуклеазы (балоксавира марбоксил). Однако высокая скорость изменчивости вирусов гриппа позволяет им быстро приобретать устойчивость к имеющимся препаратам. В связи с этим существует настоятельная необходимость поиска новых соединений, отличающихся по механизму противовирусного действия, которые были бы эффективны в отношении вирусов, устойчивых к уже имеющимся препаратам.

В качестве отдельной проблемы выступает поиск лекарственных средств для лечения парагриппозной инфекции, от которой страдают люди всех возрастных групп, причем, наиболее тяжело эта инфекция протекает у детей первых лет жизни. В настоящее время разрешенных этиотропных препаратов для лечения парагриппозной инфекции у детей первых лет жизни нет.

Таким образом, проблема поиска новых соединений, обладающих противовирусной активностью по отношению к вирусам гриппа и парагриппа, и разработка на их основе эффективных этиотропных лекарственных средств, является актуальной.

Диссертационная работа Федоровой Виктории Александровны посвящена исследованию противовирусной активности синтетических производных цитизина – алкалоида, содержащегося в растениях семейства Бобовые, который используется в медицине как дыхательный аналептик. Целью работы является характеристика активности синтетических производных цитизина в отношении вирусов гриппа и парагриппа человека.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна.

Рассматриваемая диссертация содержит новые данные, полученные с помощью классических вирусологических, биохимических, иммунологических, морфологических и электронно-микроскопических методов.

Автором проведен первичный скрининг цитотоксичности и вирусингибирующего действия 84 синтетических производных хинолизидинового алкалоида цитизина в отношении вирусов гриппа и прагриппа в экспериментах *in vitro* на клеточных культурах MDCK и MA-104. Было показано, что среди производных цитизина с низкой цитотоксичностью наибольшей противовирусной активностью обладают продукты реакции диенового синтеза (аддукты Дильса-Альдера). Противовирусная активность в отношении вируса гриппа А(Н1N1) была обнаружено у 24 соединений, из которых 4 производных цитизина также эффективно ингибировали репродукцию вирусов гриппа А(Н3N2), А(Н5N2), а одно из них (производное цитизина с N-фенилмалеинимидом) оказывало выраженный ингибирующий эффект в отношении вирусов гриппа А, В и вируса парагриппа.

В экспериментах *in vivo* по исследованию противовирусной активности синтетических производных цитизина на модели гриппозной пневмонии у белых мышей при высокой заражающей дозе вируса А(Н1N1) автором показана эффективность применения одного из двух соединений (под номером 14), отобранных из числа наиболее активных в опытах *in vitro*. Однако следует отметить, что активность данного соединения существенно уступала противогриппозному препарату Тамифлю (индексы защиты 50% и 100%, соответственно).

В экспериментах по влиянию производного цитизина на разные стадии репродукции вируса гриппа А(Н1N1) автором было показано, что препараты цитизина не являются ингибиторами нейраминидазы, а противовирусный эффект может быть связан с нарушением поздних стадий сборки вирионов и выхода вируса из клетки, так как максимальное снижение титров вируса

наблюдалось при условии внесения препарата через 4-6 часов после начала инфекции. При этом с помощью электронной микроскопии отмечалось существенное снижение количества отпочковывающихся вирусных частиц на поверхности мембраны клеток MDCK. С помощью конфокальной микроскопии автором было показано, что производные цитизина могут влиять на полимеризацию актина и организацию микротрубочек в клетках, инфицированных вирусом гриппа, что может приводить к нарушению транспорта вРНП к месту сборки вирусных частиц.

Автором показано, что последовательные пассажи вирусов гриппа А(H1N1) и парагриппа 3-го типа в присутствии нарастающих концентраций производных цитизина не сопровождаются селекцией резистентных штаммов, на основании чего делается вывод о том, что мишенью для действия синтетических производных цитизина являются не вирусные, а клеточные белки.

Достоверность результатов, сформулированных положений и выводов подтверждена достаточным объемом проведенных исследований, выполненных с привлечением современных методов, а также корректной статистической обработкой полученных результатов.

Научная новизна исследования.

Автором впервые дана характеристика цитотоксичности и вирусингибирующей активности нового класса синтетических производных цитизина в отношении респираторных вирусов человека: вирусов гриппа А подтипов H1N1, H3N2, H5N2, вирусов гриппа В линий В/Ямагата и В/Виктория и вируса парагриппа человека 3 типа. Показана зависимость противовирусной активности соединений от их химической структуры.

Впервые изучено влияние синтетических производных цитизина на разные стадии репродукции вируса гриппа.

Впервые показано, что некоторые синтетические производные цитизина обладают умеренной противовирусной активностью *in vivo* на модели летальной гриппозной пневмонии у белых мышей.

Диссертация построена традиционно, изложена на 126 страницах машинописного текста, хорошо структурирована, оформлена в соответствии с требованиями ГОСТ 7.0.11-2011, содержит 29 рисунков и 23 таблицы. Основные положения, выносимые на защиту, и выводы отражают научную новизну и практическую значимость работы. Для обзора литературы использованы, в основном, современные данные, библиографический указатель включает 186 источников, в том числе, 183 работы зарубежных авторов.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов.

Одним из достоинств диссертационной работы является проведенный автором анализ связей структурной формулы соединений производных цитизина со степенью их цитотоксичности и вирусингибирующей активности. Как показали результаты, в отличие от исходного соединения, цитизина, более 20 его синтетических производных обладают противирусной активностью в отношении вирусов гриппа и парагриппа 3-го типа. Показано, что из 9 групп исследованных соединений с различными модификациями молекулы исходного вещества наиболее перспективной в плане дальнейшей разработки является группа диеновых производных – аддукты Дильса-Альдера. Полученные данные являются основанием для целенаправленной работы по конструированию новых синтетических производных цитизина, обладающих высокой антивирусной активностью.

Заслуживающими внимания следует считать результаты исследования механизма антивирусного действия производных цитизина. Автором показано, что подавление вирусной инфекции происходит в результате нарушения поздних стадий репродукции – сборки и выхода вирусного потомства из клетки и связано с нарушением цитоскелета. Это явление требует более детального изучения в плане определения молекулярных мишеней воздействия исследуемых соединений.

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах.

Основные положения работы полностью отражены в автореферате диссертации. Апробацию результатов работы следует признать достаточной. Результаты диссертационной работы опубликованы автором в 5 печатных работах, из которых две статьи в печатных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, две статьи в журналах, индексируемых в международных системах цитирования (Scopus, Pub Med), а также три публикации в сборниках материалов научных конференций. Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на двух российских и одной международной конференции.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы.

Проблема поиска новых противовирусных препаратов является актуальной для практического здравоохранения. Проведенное соискателем сравнительное исследование противовирусной активности синтетических производных цитизина позволило выделить из множества соединений группу ингибиторов репродукции вирусов гриппа и парагриппа. По данным автора, производные цитизина, подобно противогриппозному препарату осельтамивиру (Тамифлю), нарушают поздние стадии репродукции вируса гриппа, связанные с выходом вирусных частиц из клетки. Однако, в отличие от осельтамавира, этот процесс не сопровождается селективным подавлением активности нейраминидазы. Несмотря на то, что в экспериментах *in vitro* и *in vivo* исследованные соединения по показателю соотношения цитотоксичность/эффективность серьезно уступают осельтамивиру, следует отметить, что первые результаты, полученные соискателем в ходе выполнения диссертационной работы, позволяют рекомендовать продолжение исследований по модификации и оценке противовирусных свойств вновь синтезированных производных цитидина с учетом уже

проделанной автором аналитической работы по влиянию тех или иных молекулярных замещений на токсичность и вирусингибирующую активность вещества. Примером успешного решения подобной задачи является создание одного из самых эффективных противогриппозных препаратов - осельтамивира, исходным веществом для которого также является растительный продукт - шикимовая кислота, получаемая из китайского бадьяна, которая подвергается ряду модификаций в ходе многоступенчатого синтеза через опасные промежуточные соединения.

Таким образом, полученные автором результаты могут быть использованы для дальнейших исследований в направлении разработки эффективных и безопасных противогриппозных препаратов.

При детальном ознакомлении с материалами диссертации возникли следующие замечания и вопросы.

Замечания.

1. Название п.2.12 главы «Материалы и методы»: «Получение устойчивых к синтетическим производным цитизина штаммов гриппа и парагриппа» следует считать неудачным, поскольку целью эксперимента было не получение, а исследование устойчивости вирусов к синтетическим производным цитизина. Это же замечание относится к названию п.3.6. главы «Результаты»: «Селекция вирусов гриппа и парагриппа, устойчивых к синтетическим производным цитизина», так как в результате экспериментов не было получено резистентных штаммов.

2. В разделе 3.8. «Исследование активности синтетических производных цитизина на модели летальной гриппозной пневмонии у белых мышей» (глава «Результаты») протективная активность препарата неверно представлена как «Индекс защиты, %» (табл. 23). Индекс вычисляется, как отношение интенсивных показателей выживших животных в опытной и контрольной группах, а в процентах выражается показатель защищенности, что и следовало указать в таблице.

Вопросы.

1. Чем обусловлен выбор для исследования противовирусной активности *in vivo* препаратов №11 и №14? Почему не были взяты для испытания соединения с наиболее высоким индексом селективности (№20 и №79)?

2. Почему для определения дозы ЭД₅₀ для вируса гриппа была использована РГА, а не микроскопия с определением ТЦД₅₀, как для парагриппа, или спектрофотометрия, как при определении цитотоксичности?

Сделанные замечания не снижают научной и практической ценности диссертационной работы и не влияют на общую положительную оценку полученных результатов.

Заключение

Диссертационная работа Федоровой Виктории Александровны «Изучение противовирусной активности синтетических производных цитизина в отношении вирусов гриппа и парагриппа», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология, представляет собой самостоятельно выполненную и законченную научно-квалификационную работу, результатом которой стало решение актуальной задачи – оценка антивирусной активности синтетических производных цитизина в отношении вирусов гриппа и парагриппа, что позволит использовать полученные данные в дальнейших исследованиях по разработке противовирусных препаратов.

По своей актуальности, научной новизне, объему проведенных исследований, методическому уровню, научной ценности и практической значимости рассматриваемая диссертационная работа отвечает требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 482 от 24 сентября 2013 года (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание

ученой степени кандидата наук. Автор представленной диссертационной работы – Федорова Виктория Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

Отзыв обсужден и одобрен на совместном заседании кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии и проблемной комиссии «Микробиология, эпидемиология и инфекционные болезни» ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России 17 декабря 2020 г. (Протокол № 4).

Заведующий кафедрой микробиологии,

вирусологии и иммунологии ФГБОУ

ВО УГМУ Минздрава России

д.м.н., профессор

 Сергейев Александр Григорьевич

Екатеринбург, 620028, ул. Репина, д. 3

Тел. 8 (343) 214 86 95, e-mail: aldr131250@yandex.ru

Подпись Сергеева А.Г. заверяю:

Начальник Управления кадровой

политики и правового обеспечения

ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России

Екатеринбург, 620028, ул. Репина, д. 3

Тел. 8(343) 214 86 74



Чупракова С.В.