

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Галочкиной Анастасии Валерьевны «Противовирусный потенциал антиоксидантных препаратов при лечении экспериментальной коксакивирусной инфекции у мышей», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – Вирусология

### **Актуальность темы диссертационной работы.**

Энтеровирусы (ЭВ) являются широко распространенными возбудителями вирусных заболеваний человека. Поддержанию циркуляции энтеровирусов среди населения способствуют высокая восприимчивость людей, возможность длительного вирусоносительства и способность вирусов долго сохраняться в объектах окружающей среды. Ежегодно в мире регистрируются сотни тысяч случаев энтеровирусной инфекции (ЭВИ) различной степени тяжести от лёгких лихорадочных форм до тяжёлых заболеваний. В большинстве же случаев энтеровирусная инфекция клинически никак не проявляется. Эпидемический процесс ЭВИ характеризуется спорадической заболеваемостью, сезонными подъёмами и вспышками. Наиболее частым проявлением ЭВИ является энтеровирусный менингит (ЭВМ), который требует госпитализации. Возбудителями ЭВМ могут быть различные серотипы энтеровирусов ЕСНО, Коксаки А, Коксаки В1-6. В литературе описаны эпидемические подъёмы заболеваемости ЭВМ в Екатеринбурге, когда удельный вес вирусов Коксаки В1-6 достигал 70%, а также в Дальневосточном регионе, где ведущими возбудителями энтеровирусной инфекции, в том числе энтеровирусного менингита были вирусы Коксаки В4 и Коксаки В5.

Широкий спектр клинических форм ЭВИ свидетельствует о способности энтеровирусов к репродукции в различных тканях и органах человека. Основой тканевого тропизма ЭВ является специфичность взаимодействия вирусов с рецепторами чувствительных клеток. Впервые предположение о связи ЭВ с диабетом первого типа было высказано в 1969 году, когда в крови пациентов с недавно проявившимся инсулин зависимым диабетом были обнаружены антитела к вирусу Коксаки В4. В дальнейшем энтеровирусы разных серотипов были обнаружены в крови, кишечнике и

поджелудочной железе пациентов. Считается, что механизм развития болезни связан с выработкой антител к  $\beta$ -клеткам поджелудочной железы, инфицированным вирусами. В литературе указано, что вероятной причиной дисфункции  $\beta$ -клеток поджелудочной железы является их инфицирование вирусом Коксаки В4. Предполагается, что формируется прямой ответ Т-клеток на вирусный антиген, что приводит к деструкции  $\beta$ -клеток. Сокращение числа нормально функционирующих  $\beta$ -клеток, нарушает процесс выработки инсулина и приводит к развитию инсулин зависимого диабета первого типа. Одним из главных механизмов повреждения поджелудочной железы, вызванных вирусной инфекцией, считается окислительный стресс. В связи с тем, что  $\beta$ -клетки обладают слабой антиоксидантной защитой, использование антиоксидантов в терапии могло бы приостановить или ослабить процесс поражения клеток поджелудочной железы.

В связи с изложенным, диссертационная работа А.В. Галочкиной, цель которой – оценка терапевтического потенциала антиоксидантов растительного происхождения при лечении экспериментальной инфекции, вызванной энтеровирусом Коксаки В4, является современной и весьма актуальной.

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

Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, обоснованы использованием большого арсенала современных методов исследования, а также большим объёмом проведённых исследований.

Показано, что дигидрокверцетин – флавоноид, экстрагированный из коры лиственницы сибирской, имеет высокую антиоксидантную активность в бесклеточной системе, наряду с его соединением с цинком, а также с экстрактом антиоксидантов ели сибирской. При совместной инкубации дигидрокверцетина с вирусом Коксаки В4 титр вируса не снижался, т.е. препарат не разрушает вирионы и, следовательно, не обладает вирулицидным действием.

В экспериментах на культурах клеток показано, что дигидрокверцетин обладает ингибирующим действием, активно ингибируя вирусы Коксаки В4, Коксаки В3 и вирус гриппа (А/PR/8/34), что было подтверждено методом бляшкообразования. Противовирусная активность дигидрокверцетина была

наибольшей среди всех изученных антиоксидантов, особенно эффективным препарат оказался в отношении вируса Коксаки В4.

На модели энтеровирусной инфекции у белых мышей доказано, что дигидрокверцетин обладает противовирусной активностью, снижая титры вируса Коксаки В4. При этом повышается уровень антиоксидантной защиты и снижается степень воспалительных процессов в поджелудочной железе и нормализуется ее морфологическая структура, поскольку препарат препятствует формированию вирусспецифических структур в клетках, выявленных при помощи электронно-микроскопического анализа.

Установлено, что мишенью противовирусного действия дигидрокверцетина является сам энтеровирус, причем наибольшую активность дигидрокверцетин проявляет на ранних стадиях репликации вируса Коксаки В4.

Поставленные задачи решены и нашли полное отражение в выводах диссертации. Достоверность полученных результатов и обоснованность научных положений и выводов не вызывает сомнений, благодаря высокому методическому уровню проведенных вирусологических и экспериментальных исследований.

**Научная новизна исследования и теоретическое значение полученных автором результатов.**

Разработана экспериментальная модель на белых мышах для оценки противовирусной активности природных антиоксидантов при энтеровирусной инфекции, вызванной экспериментальным заражением вирусом Коксаки В4. На этой модели изучен патогенез вирусного панкреатита, вызванного вирусом Коксаки В4.

Впервые оценена противовирусная активность антиоксидантных препаратов в отношении вируса Коксаки В4 *in vitro* и *in vivo* и описаны возможные механизмы действия антиоксидантов как противовирусных веществ в отношении вируса Коксаки В4.

Впервые доказано, что препарат дигидрокверцетин является эффективным противовирусным средством в отношении вируса Коксаки В4.

Теоретическое значение исследования заключается в том, что оно позволяет дополнить существующие исследования по изучению противовирусной активности антиоксидантов, дает возможность оценить перспективы создания комплексных

противовирусных препаратов для лечения энтеровирусной инфекции, вызванной вирусами Коксаки В1-6, в том числе на основе антиоксидантов.

#### **Практическая значимость диссертационного исследования.**

Практическая значимость диссертационной работы определяется тем, что на основе изучения ряда препаратов антиоксидантов выбран наиболее активный антиоксидант дигидрохверцетин. Установлено, что кроме антиоксидантной активности дигидрохверцетин обладает противовирусной активностью в отношении вируса Коксаки В4. Его эффективность в качестве противовирусного препарата показана как в опытах *in vitro* на культуре клеток Vero, так и *in vivo* на предложенной автором экспериментальной модели на белых мышах на разных стадиях репродукции вируса Коксаки В4 в поджелудочной железе.

Доказанная на экспериментальной модели противовирусная активность дигидрохверцетина в отношении вирусов Коксаки В4 и Коксаки В3 свидетельствует о возможности расширения арсенала лекарственных средств, которые могут быть использованы для лечения энтеровирусной инфекции, обусловленной вирусами Коксаки В1-6, а также для профилактики развития диабета первого типа после перенесения энтеровирусной инфекции.

#### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы.**

Разработанная экспериментальная модель с использованием белых мышей, на которой показана динамика репродукции вируса Коксаки В4 в поджелудочной железе и оценена противовирусная активность антиоксиданта дигидрохверцетина в отношении вируса Коксаки В4, может быть использована другими исследователями для проведения подобных экспериментов.

#### **Соответствие работы требованиям, предъявляемым к диссертациям.**

Диссертационная работа А.В. Галочкиной представляет собой завершённое исследование, содержит введение, обзор литературы, материалы и методы, главу результаты собственных исследований, состоящую из 8 разделов, обсуждение, выводы и список литературы. Материалы изложены на 113 страницах машинописного текста, иллюстрированы 20 таблицами и 51 рисунком. Список литературы включает 120 источников литературы отечественных (9) и зарубежных (111) авторов.

Обзор литературы, содержащий 6 разделов, соответствует поставленным автором задачам, которые решаются в разделе собственных исследований.

В главе «Материалы и методы» описаны исследуемые в работе препараты (дигидрохверцетин, его комплексные соединения с ионами металлов, экстракт антиоксидантов ели сибирской и его фракции), штамм вируса Коксаки В4 – Powers из Государственной коллекции вирусов ФГБУ «НИИ Вирусологии им. Д.И.Ивановского», две культуры клеток Vero (клетки почки зеленой мартышки) и L-929 (клетки фибросаркомы мыши), а также разнообразные методы исследования (вирусологические, в том числе реакция бляшкообразования, биохимические, гистологические, электронно-микроскопические, аналитические, статистические и экспериментальные на животных моделях), позволившие автору выполнить запланированные исследования для решения поставленной цели.

В главе собственных исследований представлены результаты оценки антиоксидантной активности исследуемых препаратов, свидетельствующие о том, что наиболее активным антиоксидантом является дигидрохверцетин. Результаты оценки противовирусной активности препаратов показали, что дигидрохверцетин эффективно ингибировал вирусы Коксаки В4 и Коксаки В3.

Весьма интересны данные, касающиеся разработки экспериментальной модели на животных для изучения патогенеза экспериментального панкреатита, в частности динамики репродукции вируса Коксаки В4 в поджелудочной железе, и противовирусной активности дигидрохверцетина в отношении вируса Коксаки В4.

В целом, диссертационная работа выполнена на высоком современном методическом уровне, хорошо оформлена, иллюстрирована, большим количеством рисунков и таблиц.

Выводы и автореферат соответствуют материалам диссертации, которые отражены в 6 печатных работах, в том числе в 4 статьях, опубликованных в журналах, рекомендованных ВАК, и в рецензируемых зарубежных изданиях.

Работа апробирована на отечественных и зарубежных конференциях.

Замечаний по диссертационной работе нет.

Вместе с тем имеется ряд вопросов:

1. Известно, что препарат дигидрохверцетин уже широко используется в качестве противоотечного, дезинтоксикационного, капилляропротективного и антиоксидантного средства. Возможно ли в будущем расширение

показаний к его применению, в частности в качестве противовирусного препарата для комплексной терапии энтеровирусной инфекции, вызванной вирусом Коксаки В4, который оказывая повреждающее действие на поджелудочную железу может провоцировать развитие инсулин зависимого диабета первого типа?

2. В экспериментах показано, что дигидрохверцетин действует на ранних стадиях репликации вируса Коксаки В4 в инфицированных клетках. Вирус присутствует в экскретах организма в максимальных концентрациях в ранние периоды заболевания. В связи с длительной расшифровкой этиологического фактора энтеровирусной инфекции вирусологическими и даже молекулярными методами, назначение этиотропных препаратов может быть отсрочено. Возможно ли использовать дигидрохверцетин на поздних сроках заболевания с целью профилактики развития инсулин зависимого диабета первого типа?
3. В обзоре литературы (в разделах актуальность проблемы и эпидемиология энтеровирусной инфекции) приводятся данные в основном о зарубежных вспышках энтеровирусной инфекции, вызванных рядом серотипов энтеровирусов, в списке литературы также преобладают иностранные источники. Располагаете ли вы сведениями о вспышках или сезонных подъемах заболеваемости энтеровирусной инфекцией на территории Российской Федерации в последние годы?

#### **Заключение.**

Диссертационная работа Галочкиной Анастасии Валерьевны «Противовирусный потенциал антиоксидантных препаратов при лечении экспериментальной коксакивирусной инфекции у мышей», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология, является завершённой научно-квалификационной работой, актуальной для современной вирусологии.

Использование в работе вирусологических и других методов исследования позволило оценить противовирусный потенциал антиоксиданта дигидрохверцетина в отношении вируса Коксаки В4 при экспериментальной инфекции, что может служить отправной точкой для дальнейших разработок в направлении создания противовирусных средств на основе антиоксидантов, в частности

дигидрокверцетина, для комплексного лечения энтеровирусной инфекции, обусловленной энтеровирусами Коксаки В1-6. Изучение патогенеза вирусного панкреатита, вызванного энтеровирусом Коксаки В4, с помощью разработанной экспериментальной модели на мышах и доказанное в опытах *in vitro* и *in vivo* наличие противовирусной эффективности дигидрокверцетина в отношении вируса Коксаки В4, указывают на возможность использования антиоксидантов с профилактической целью для предотвращения развития диабета первого типа, который может возникать после перенесения энтеровирусной инфекции, этиологическим фактором которой являются энтеровирусы Коксаки В1-6.

По актуальности, научной новизне, объёму выполненных исследований, практической значимости и достоверности полученных результатов диссертация полностью отвечает требованиям п. 9 Положения о порядке присуждения учёных степеней (утверждено постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор А.В. Галочкина заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02-вирусология.

ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, 197101, Санкт-Петербург, улица Мира, дом 14.

Романенкова Н.И. - ведущий научный сотрудник лаборатории этиологии и контроля вирусных инфекций  
тел: (812) 233-21-56, e-mail: [poliospb@nr3854.spb.edu](mailto:poliospb@nr3854.spb.edu)

Ведущий научный сотрудник лаборатории  
этиологии и контроля вирусных инфекций  
ФБУН НИИ эпидемиологии и  
микробиологии имени Пастера, к.м.н.

Н.И.Романенкова

7 февраля 2017года

Подпись Романенковой Натальи Ивановны удостоверяю:

Учёный секретарь ФБУН НИИ  
эпидемиологии и микробиологии  
имени Пастера, к.м.н.



Г.Ф.Трифонова