

## О Т З Ы В

*официального оппонента на диссертационную работу ШТРО  
Анны Андреевны «ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ УСНИНОВОЙ  
КИСЛОТЫ В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ГРИППА», представленную на соискание  
ученой степени кандидата биологических наук по специальности «03.02.02 –  
вирусология»*

### АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ

Грипп является острым респираторным заболеванием, наносящим вред здоровью людей и приводящим к огромным экономическим потерям. Борьба с этим заболеванием является одной из приоритетных задач здравоохранения многих стран мира и имеет важное медико-социальное значение. В дополнении к вакцинации как основной стратегии борьбы с гриппозной инфекцией Всемирной Организацией Здравоохранения рекомендовано применение противогриппозных этиотропных препаратов. Круг лицензированных препаратов, то есть прошедших полное доклиническое изучение с доказанной эффективностью и безопасностью в клинических исследованиях очень ограничен, при этом помимо побочных эффектов, для большинства из них известна лекарственная резистентность.

Большая часть смертельных исходов от гриппа обусловлена вторичными бактериальными осложнениями. В некоторых клинических исследованиях показано, что использование противогриппозных препаратов для лечения гриппозной инфекции приводит к снижению количества дальнейших бактериальных осложнений, и связанным с ним использованием антибиотиков. Тем не менее, идеальным являлось бы использование препаратов с направленным действием обоих патогенов. В связи с вышеперечисленным, поиск и создание эффективного и безопасного препарата, обладающего как антибактериальным так и противовирусным эффектом, является перспективным направлением, над которым в настоящее время работают в ведущих лабораториях мира. В связи с вышесказанным актуальность работы диссертационной работы Штро А.А. **«ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ГРИППА»** посвященной изучению противовирусного действия с уже выявленной антибактериальным действием производных усниновой кислоты в отношении вируса гриппа не вызывает сомнений и соответствует современной постановке задачи.

## **НАУЧНАЯ НОВИЗНА РАБОТЫ**

В данной работе впервые в культуре клеток и на модели гриппозной пневмонии мышей у производных усниновой кислоты выявлена противогриппозная активность. Впервые для этого ряда в культуре клеток установлены закономерности активность- химической структура. Показано, что производные усниновой кислоты проявляют антинейраминидазную активность, установлен сайт связывания производных усниновой кислоты с молекулой вирусной нейраминидазы 1 типа, что позволило разработать концепцию создания ингибиторов на основе би- и три-циклических соединений.

## **ЗНАЧЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ДЛЯ НАУКИ И ПРАКТИКИ**

Полученные данные дают рекомендации, служащие основанием для дальнейшего направленного поиска в химическом ряду аналогов усниновой кислоты, оптимизации изученных химических соединений с целью создания новых безопасных и эффективных перспективных препаратов широкого спектра действия.

## **ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ.**

Диссертация соответствует общим требованиям к оформлению кандидатских и докторских диссертаций, утверждёнными в ГОСТ Р 7.0.11–2011. Диссертация изложена на 134-х 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 19 таблицами и 37 рисунками. Библиографический справочник включает 127 источника на русском и иностранных языках.

Во введении отмечена актуальность темы, поставлены цели и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, отражены степень изученности данной проблемы, научная новизна и практическая значимость работы, изложены методологические подходы к ее решению.

**Обзор литературы** охватывает проблемы этиологии, профилактики и лечения гриппозной инфекции, проводится анализ разрабатываемых и лицензируемых противогриппозных препаратов. Большая часть обзора посвящена имеющимся в настоящее время данным по биологическим свойствам усниновой кислоты. Обзор легко читается, достаточно полно освещает практически все проблемы, затронутые в диссертации.

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

Центральной частью работы являются полученные диссертантом **Собственные результаты исследования**, которые условно можно разделить на несколько частей. В первой части проведено изучение цитотоксичности и противовирусной активности в отношении вирусов гриппа А производных усниновой кислоты. Для этого был использован традиционный классический подход медицинской химии, доказавший свою состоятельность во многих исследованиях, так называемые исследования структура- активность. Исследования проведенные автором позволили определить эффект заместителей в проявлении противовирусных и цитотоксических свойств и дать ряд рекомендаций для дальнейшего улучшения противовирусных свойств производных усниновой кислоты, путем введения в различные положения определенных химических групп, то есть создания leader – и далее hit- молекул среди соединений этого ряда.

Следующая часть исследования посвящена определению эффективности *на модели гриппозной пневмонии мышей* различающихся структурно производных усниновой кислоты, у которых была выявлена наиболее высокая активность в опытах *in vitro*. *Несмотря на то, что* статистически достоверное снижение титра вируса было отмечено для 3 из изученных соединений, только 575 соединение из этих трех достоверно снижало смертность инфицированных животных по сравнению с группой вирусного контроля. Эти данные были подтверждены гистологическими исследованиями легких, в которых показано, что лечение соединением 575 приводило к ограничению размеров очагов пневмонии у животных, нормализации структуры легочной ткани, в том числе повышению степени воздушности респираторных отделов. Тем не менее по всем параметрам эффективности ( клиническим, вирусологическим, гистологическим) соединение 575 уступало препарату сравнения ремантадину.

Следующая часть собственных результатов исследования посвящена определению механизма вирусингирующего действия соединений производных усниновой кислоты. Показано отсутствие вирулицидного действия у изученных соединений. Серия опытов по временным интервалам добавления молекул позволила предположить эффект соединений на ранние стадии вирусной репродукции. В дальнейших опытах было показано, что изучаемые соединения не влияют на проникновение вируса в клетки, что отразилось в отсутствии их эффекта на гемолитическую активность эритроцитов, индуцированную вирусом гриппа. В то же время выявлен эффект, хотя невысокий, соединений, в частности 575 на нейраминидазную активность вирусов гриппа А, включая озельтамивиррезистентный вирус гриппа

А/Владивосток/2/09 с мутацией в положении 275, ответственной за резистентность к озельтамивиру. Логическим продолжением исследования явилось компьютерное моделирование взаимодействия белка нейраминидазы с соединением 575, проявившим наибольшую антинейраминидазную активность. Оказалось, что оно связывается с молекулой нейраминидазы в сайте, не входящем в состав каталитического центра фермента, что позволяет предположить, что соединения этого ряда являются аллостерическими ингибиторами этого фермента. В завершающей части работы автором предпринята попытка получить резистентные к соединению 575 мутанты, однако после 13 пассажей в присутствии увеличивающихся концентраций соединения их не удалось типировать как фенотипически, так и при секвенировании генов гемагглютинина, нейраминидазы и М2-белка вируса гриппа.

Полученные автором экспериментальные результаты обработаны статистически, трактуются однозначно и не вызывают сомнений в их достоверности, изложены четко и логично

**В разделе Обсуждение** автор анализирует полученные данные и оценивает их с позиций мирового научного опыта, обобщая проделанную работу.

**Выводы** оппонируемой диссертации обоснованы и соответствуют поставленным задачам, подводят итог проведенным исследованиям и достаточно полно отражают результаты, полученные автором.

Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях, а также опубликованы в рецензируемых российских и международных журналах. Автореферат и опубликованные работы отражают основное содержание диссертации.

## **ЗАМЕЧАНИЯ И ВОПРОСЫ**

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

1. Некоторые методы требуют более подробного описания, например в описании экспериментов на животных не описаны каким образом были определены числовые характеристики эффективности соединений – средняя продолжительность жизни, индекс защиты, потеря веса ( формулы). Также не указано каким образом получали конечный вирус после 13 пассажей для изучения его возможной резистентности к соединению 575 .
2. В данных диссертации при изучении широты спектра производных усниновой кислоты нет данных об их активности в отношении вируса гриппа В . Есть ли у Вас такие данные, если есть то какие?

3. Почему в опытах *in vitro* по изучению антинейраминидазной активности Вы использовали в качестве препарата сравнения озельтамивир, если известно, что это prodrug и в опытах такого рода он обладает очень низкой активностью.

4. В Ваших экспериментах на модели гриппозной пневмонии мышей соединения обладали умеренной активностью. На основании чего были выбраны использованные Вами схема и путь лечения, есть ли у Вас какие-либо данные по фармакокинетике этих соединений? Возможно принятая для озельтамивира схема лечения 2 раза в сутки или для занамивира интраназальный путь введения смогли бы быть более эффективны?

Однако, возникшие вопросы и замечания ни в коей мере не снижают значимость и ценность работы, а скорее могут служить основой для новых идей и дальнейших исследований.

### **ОБЩАЯ ОЦЕНКА ДИССЕРТАЦИИ**

В целом можно констатировать, что представленная Штро А.А. диссертация является законченной научно-исследовательской работой, содержащей решение актуальной научной задачи-поиску среди производных усниновой кислоты соединений, обладающих противогриппозной активностью и изучению механизма этой активности. Диссертация полностью соответствует паспорту заявленной научной специальности «03.02.02 – вирусология»

Штро А.А. 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 Анны Андреевны «ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ГРИППА» по актуальности, новизне, научно-практической значимости несомненно отвечает требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» в редакции Постановлений Правительства РФ от 20.04.2006 №228, от 02.06.2008 №424, от 06.05.2009 №390, от 20.06.2011 №476, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук.

Штро А.А. заслуживает присуждения ей искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

10 ноября 2014 г.

Официальный оппонент – заведующая лабораторией

экспериментальной вирусологии ФГБУ НИИВС им. Мечникова РАМН

доктор биологических наук

И.А.Ленева

