

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 гемагглютинаина, 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

