

ОТЗЫВ

официального оппонента,

кандидата биологических наук Алексева Александра Юрьевича на диссертацию **Соловарова Иннокентия Сергеевича** «Использование экстрактов растений и ДНК-аптамеров в качестве источников новых препаратов, обладающих противовирусной активностью в отношении вируса клещевого энцефалита», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – Вирусология.

Актуальность темы диссертационной работы

Клещевой энцефалит (КЭ) – это инфекционное заболевание, вызываемое вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ), одна из наиболее распространенных природно-очаговых нейроинфекций, передающихся через укус иксодовых клещей. Несмотря на очевидную эпидемическую значимость этого заболевания, до сих пор существует единственный препарат для специфического лечения и профилактики КЭ – донорский иммуноглобулин человека. Разработка новых средств надежной и специфической терапии КЭ является актуальнейшей задачей фундаментальной и прикладной науки. Объектом исследования являются перспективные источники новых препаратов против КЭ – ДНК-аптамеры, а также экстракты веществ из растительного сырья, в том числе отдельные фракции и кандидатные компоненты.

В настоящее время остается актуальным вопрос как своевременной и качественной диагностики, так и использования надежных и безопасных средств лечения данной инфекции. В этом аспекте КЭ остается одним из опасных и непредсказуемых по последствиям природно-очаговых инфекций. Современное состояние уровня понимания процессов КЭ позволяет проводить качественный мониторинг границ его распространения. Несмотря на это, все еще остается актуальной потребность в наличии более инновационных, надежных, специфических и современных лекарственных средств.

Автором проанализирована основная доступная информация о современных достижениях в разработке потенциальных молекул-ингибиторов вируса клещевого энцефалита. Описаны некоторые рекомбинантные антитела, включая химерные и гуманизированные антитела, которые могут стать дополнительным методом для иммунотерапии КЭ в будущем. Лабораторно сконструированные иммуноглобулины имеют некоторые преимущества перед препаратами, которые получают из крови человека. Нуклеотидные аналоги в качестве ингибиторов вирусных полимераз ДНК- или РНК-вирусов зарекомендовали себя как надежные средства в терапии многих серьезных заболеваний. На сегодня известны нуклеотидные ингибиторы ВКЭ, которые показали эффективность в экспериментах, однако не все дошли до клинических испытаний. Ряд

нуклеотидных аналогов, которые имеют эффект ингибирования ВКЭ, могут часто оказывать в экспериментах цитотоксическое действие на культуру клеток. На сегодняшний день никакие схемы специфического лечения низкомолекулярными противовирусными препаратами не были признаны или широко внедрены. Несмотря на огромный прогресс и большое количество молекул-ингибиторов ВКЭ *in vitro*, до сих пор в мире нет официально одобренного и зарегистрированного противовирусного препарата против ВКЭ.

Комплексные исследования веществ растительного происхождения являются одним из активно развиваемых в последние годы направлений по нахождению и идентификации противовирусных средств. При этом для огромного количества уже идентифицированных компонентов из растительных источников до сих пор не получены данные о биологических свойствах для тех или иных вирусных инфекций, что в свою очередь скрывает огромный потенциал для создания новых противовирусных препаратов. Автором проанализированы существующие работы по поиску противовирусных молекул к ВКЭ из растительных источников.

В целом, актуальность выявления и идентификации в экстрактах растений и в библиотеках ДНК-аптамеров новых молекул и веществ, обладающих вирулицидной активностью в отношении вируса клещевого энцефалита сомнений не вызывает.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Соловаровым И.С. в результате проведенной работы обнаружено, что водные экстракты трех лекарственных растений (гипекоум прямой *Hypocoum erectum*, змеевик большой *Polygonum bistorta*, харитаки *Terminalia chebula*) обладают прямым вирулицидным действием в отношении ВКЭ. Очистка и идентификация наиболее активно действующего экстракта (*T. chebula*) позволили идентифицировать три химических компонента – пуникалагин, тригаллоил глюкозу и корилагин. Автором подтверждено, что химически чистые компоненты – пуникалагин, тригаллоил глюкоза и корилагин – обладают прямым вирулицидным действием в отношении ВКЭ. Проведен сравнительный анализ вирулицидного действия компонентов на вирус и цитотоксического действия на используемую культуру клеток почек эмбриона свиньи (СПЭВ). Установлено, что тригаллоил глюкоза обладает наибольшим индексом селективности среди выявленных вирулицидных молекул.

Также, в итоге работы, проведен отбор пула аптамеров, способных связываться с вирусными частицами клещевого энцефалита, и определены нуклеотидные последовательности 16 новых аптамеров. В компьютерной биологии все больше внимания

уделяется работам, посвященным анализу и предсказанию возможных 3D-структур при взаимодействии молекул-мишеней с молекулами-ингибиторами. Данная работа является частью исследований по анализу механизмов взаимодействия нуклеиновых кислот с молекулами-мишенями. Потенциально аптамеры могут стать более удобной и эффективной заменой иммуноглобулинов в диагностических системах к ВКЭ.

Практическая значимость исследования

В процессе работы показана применимость использованных методов хроматографического разделения водных экстрактов для массового поиска и идентификации химических компонентов, обладающих противовирусной активностью. Полученные автором данные о биологической активности химических компонентов *in vitro* имеют важное прикладное значение, так как позволяют перейти к проверке противовирусной активности веществ *in vivo*. По результатам исследований разработаны три средства, обладающие противовирусным действием в отношении вируса клещевого энцефалита, о чем получены три патента (Патент РФ 2798102, опубл. 15.06.2023; патент РФ 2809094, опубл. 06.12.2023; патент РФ 2812292, опубл. 29.01.2024).

Ожидается, что идентифицированные компоненты могут стать эффективным дополнением существующих противовирусных средств в профилактике и лечении КЭ. Разработанные в ходе исследования методики пригодны для идентификации активных компонентов из многокомпонентных водных экстрактов других растений.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, двух глав результатов, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы. Раздел обсуждение не присутствует, обсуждение представлено в каждом соответствующем разделе. Работа изложена на 159 страницах, содержит 1 таблицу и 34 рисунка. Библиографический список включает 396 источников, в том числе 53 – на русском языке и 343 – на иностранных языках.

Автором подробно обоснована актуальность темы исследования, о чем я уже указал выше, определены цель, задачи диссертационной работы, методология исследования, сформулированы положения, выносимые на защиту, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, описана апробация результатов исследования и личный вклад автора.

Глава «Обзор литературы» написана грамотным языком и соответствует тематике данной работы: она включает 3 больших раздела с подразделами («Вирус клещевого

энцефалита», «Лекарственные средства на основе растений» и «Аптамеры»). К сожалению, в конце этой главы или каждого внутреннего раздела не имеется заключения.

Глава «Материалы и методы» очень полно представляет использованные методики и свидетельствует о большом объеме проделанной автором работы.

Следующие две главы представляют собой результаты и обсуждение выполненной работы. Глава «Противовирусные свойства экстрактов» имеет 4 раздела, в которых представлены результаты исследований. В части, касающейся обсуждения результатов, в данной главе соискатель приводит глубоко осмысленный и подробный анализ полученных результатов исследования. Глава «Проверка вирулицидного действия аптамеров и синтетических аналогов идентифицированных веществ из *T. chebula*» не имеет выделенных разделов, но структурирована на две условные части курсивом с наименованием работ и представлением результатов исследований. В данной главе автор также проводит обсуждение полученных результатов, хотя и кратко.

В разделах «Заключение» и «Выводы» представлены все полученные автором результаты. Выводы диссертации четко сформулированы, обоснованы, закономерно вытекают из полученных результатов и соответствуют поставленным задачам.

В целом, диссертация соответствует специальности, по которой она представлена к защите, написана ясно и логично, а ее оформление отвечает существующим требованиям. В автореферате отражены основные результаты диссертационной работы.

Достоверность результатов, обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций обеспечивается комплексным подходом к их достижению с привлечением современных вирусологических, молекулярно-генетических, физико-химических, цитологических и статистических методов, а также научно обоснованными выводами и наличием научных публикаций в высокорейтинговых журналах. Достоверность поддерживается также большим объемом экспериментальных данных по изучению противовирусных свойств экстрактов растений, фракций экстрактов, идентифицированных компонентов из экстрактов и ДНК-аптамеров с использованием вирусологических методов, адекватных целям и задачам исследования, а также методов статистической обработки полученных результатов.

Научные положения, выводы и заключение, сформулированные в диссертации, обоснованы объемом проведённых исследований, методическими подходами, использованием современных методов исследования. Основные положения, выносимые на защиту, и выводы логично вытекают из полученных результатов. Достоверность

полученных результатов и обоснованность научных положений и выводов не вызывают сомнений.

Публикации и апробация результатов, представленных в диссертации.

Результаты работы отражены в 7 публикациях в отечественных и зарубежных изданиях, из которых 5 – статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для защиты диссертаций. Также опубликовано три патента, о чем в автореферате и диссертации указано как о подаче заявок на изобретение.

Результаты работы неоднократно устно представлены автором на различных международных конференциях.

Вопросы и замечания к диссертационной работе

Работа однозначно оценивается положительно. Некоторые замечания в оформлении не являются критическими для этого хорошего исследования. Присутствуют некоторые опечатки и несогласованные предложения в тексте диссертации (например: на странице 10, строки 2, 4; на строке 5 повтор текста). В списке литературы присутствует дублирование ссылок 8 и 9.

Ниже некоторые комментарии, на которые хотелось бы получить ответы и мнение автора.

1. В Актуальности и в главе «Обзор литературы» представлены разные данные по количеству регистрируемых клинических случаев заболевания клещевым энцефалитом на территории Европы и Азии – 10000-12000 клинических случаев и более 13000 клинических случаев ежегодно. Какие данные более верны?
2. К сожалению, я не обнаружил в диссертации описаний свойств выбранного для использования изолята ВКЭ 92М и обоснования выбора именно этого варианта. Почему не использован более современный коллекционный охарактеризованный штамм ВКЭ? При поиске информации по указанной ссылке (№8) можно найти описание некоторых свойств изолята 92М, в том числе год его выделения и место сбора материала – 2001 год, Монголия. Также там указано, что этот изолят вируса по данным нуклеотидной последовательности гена Е белка оболочки проявляет наибольшее сходство с сибирскими субтипами ВКЭ, но формирует отдельную ветвь. Несомненно, автор располагает критериями выбора и описанием актуальности этого изолята, которые, к сожалению, не указаны в тексте диссертации.
3. Автор диссертации в разделе Практическая значимость указал, что по результатам исследований разработаны три средства, обладающие

противовирусным действием в отношении вируса клещевого энцефалита, о чем поданы заявки на изобретение (регистрационные номера Роспатента № 2022124073 от 09.09.2022; № 2022127567 от 24.10.2022; № 2022124073 от 09.09.2022). Во-первых, в перечне опечатка – дублируются первая и третья заявки. Во-вторых, при поиске опубликованных патентов обнаруживается, что к настоящему времени все три заявки на патенты удовлетворены: патент РФ 2798102, опубл. 15.06.2023; патент РФ 2809094, опубл. 06.12.2023; патент РФ 2812292, опубл. 29.01.2024. Автореферат подписан в печать 25 января 2024 года. Возникает вопрос, почему автор не указал наличие патента, как минимум первого, данные о котором были опубликованы еще летом прошлого года? По крайней мере, это бы добавило еще одну публикацию к перечню, а также усилило Практическую значимость.

4. В текстах и на рисунке 29 Диссертации или рисунке 8Б Автореферата диссертации представлена разная информация по данным сравнения 50% эффективных концентраций (EC50) идентифицированных компонентов. Например, в текстах указано вирулицидное значение EC50 у тригаллоил глюкозы равное 0,009 мг/мл, на рисунках 29 Диссертации и рисунке 8Б Автореферата равное 0,014 мг/мл. Кроме того, если посмотреть на данные опубликованного патента 2809094 на тригаллоил глюкозы, в нем указано другое значение 50% эффективной концентрации равное 0,0065 мг/мл. Где указана правильная информация?

5. В качестве комментария: при исследовании живых систем, в качестве отрицательного контроля предпочтительно использовать буферные изотонические растворы, например 0,9% натрия хлорид (физиологический раствор) или фосфатно-солевой буфер (ФСБ), который соискатель использовал только в главе 4.

В целом, работа оценивается положительно, вопросы и комментарии не являются принципиальными, нисколько не умоляют ценности и качества работы.

Заключение

Диссертационная работа Соловарова Иннокентия Сергеевича «Использование экстрактов растений и ДНК-аптамеров в качестве источников новых препаратов, обладающих противовирусной активностью в отношении вируса клещевого энцефалита», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 - Вирусология (биология) является завершенной научно-квалификационной работой, в которой, на основе выполненных автором исследований

показана возможность использования некоторых экстрактов растений и ДНК-аптамеров в качестве источников новых противовирусных препаратов; идентифицированы и описаны три кандидатных вещества (корилагин, тригаллоил глюкоза и пуникалагин), обладающих *in vitro* противовирусной активностью в отношении вируса клещевого энцефалита.

Диссертация и автореферат полностью соответствуют критериям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 № 723, от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а сам автор, Соловаров Иннокентий Сергеевич, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

Официальный оппонент: руководитель лаборатории экспериментальной биологии патогенных микроорганизмов НИИ вирусологии ФГБУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Научно-исследовательский институт вирусологии, e-mail: al-alexok@yandex.ru
Тел. +7 913-716-67-78
к.б.н. Алексеев Александр Юрьевич

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, 630117, ул. Тимакова, д. 2
телефон/факс приемной: +7(383)333-64-56.

Личную подпись А.Н. Алексеева заверяю
вед. специалист отдела кадров ФИЦ ФТМ
"06" марта 2024 г. подпись С.В. Венедиктова

