

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертационную работу Филипповой Екатерины Игоревны
«Противовирусные свойства экстрактов и фенольных соединений
культивируемых и дикорастущих растений Юго-Западной Сибири»,
представленную на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности: 1.5.10 – вирусология

Лекарственные растения - важная часть народной медицины на протяжении веков – от Аюрведической медицины Индии до тибетской системы медицины Амчи – сова-ригпа. В аюрведе, применяемой уже две тысячи лет, зарегистрировано более 700 растительных препаратов, клинические эффекты которых разделены на 50 классификаций. Столетиями и многонациональное население России использовало растения для самолечения. Лечебное действие растений было тщательно собрано знахарями и зафиксировано в летописях и рукописях. В 1778 г. Россия в числе первых в мире стран ввела в действие национальную фармакопею: Российскую фармакопею в Санкт-Петербурге, которая содержит 770 монографий, из них 316 текстов по лекарственным растительным препаратам.

Советская медицина и академическая наука, продолжая традиции русской медицины, систематически и многогранно исследовали биологические, фармакологические и медицинские аспекты использования растений в различных регионах огромной, климатически разнообразной страны, с богатым биоразнообразием растений, произрастающих в местах обитания с суровыми климатическими условиями.

Современная медицина и постоянно изменяющийся микромир предъявляют новые утилитарные требования к научным биологическим знаниям. На настоящем этапе существования человечества в структуре инфекционной патологии, прежде всего, вирусные заболевания представляют колоссальную угрозу для популяции людей и животных в целом. Вспышки новых вирусных инфекций, бесконечная эволюция вирусов, в том числе - изменчивость «старых» патогенов при недостатке эффективных противовирусных средств, влияют на жизнь и здоровье людей, в этой связи создание новых противовирусных препаратов является одной из важнейших и актуальных задач современной медицинской науки. Несмотря на разработку новых лекарств из синтетических источников, лекарственные растения продолжают служить основным сырьем для препаратов. Сибирь представляет собой беспрецедентную экологическую нишу с огромным географическим пространством и разнообразным климатом, богатством ресурсов сибирских лекарственных растений, с возможностью выделения и изучения их биологически активных метаболитов, и сильнодействующих эндосимбионтов из растений, с современным исследованием их фармакологического использования – все это остро назревшая потребность. Ряд растительных субстратов из флоры Сибири могут, в том числе, обладать и уникальными противовирусными механизмами действия, и стать кандидатами для дальнейших клинических исследований.

Согласно современной Стратегии ВОЗ в области народной медицины 2014 – 2023 гг., развитию этой бурно развивающейся сегодня области здравоохранения необходимо уделять пристальное внимание на государственном уровне. С 1986 г. лекарственные средства растительного происхождения - тема заседаний Международной конференции по регулированию лекарственных средств (ICDRA), с 2006 г. - ежегодных совещаний в рамках Международного сотрудничества в области регулирования лекарственных средств растительного происхождения (IRCH).

Ключ к успешной интеграции этой медицины в национальные системы здравоохранения – современные знания.

Многое еще предстоит узнать в ходе контролируемых клинических испытаний; в равной степени важны все методы и этапы исследований, включая изучение тонких механизмов лечебного воздействия и эффективности различных моделей применения лекарственных растительных средств *in vitro* и *in vivo* - основу доказательного подхода к «природным лекарствам».

Целью таких исследований может быть формирование широкой базы национальных данных, отражающей, в том числе, и особенности этнофармакологии РФ. Принципиально важно - эти исследования должны быть междисциплинарными, включая современные знания молекулярной биологии, фармакогеномики, геномики, протеомики и др. родственных дисциплин.

С этих позиций исследование Филипповой Екатерины Игоревны по идентификации и изучению противовирусных свойств у культивируемых и дикорастущих растений Юго-Западной Сибири – базисный фундаментальный этап долговременной системы исследований богатых растительных ресурсов Сибири. В перспективе такие исследования должны привести не только к получению новых таргетных лекарственных средств, но и к неизбежной реализации современной концепции голобионта как совокупности организма растения и ассоциированных с ним микроорганизмов, с их прямой стимуляцией роста растений; стрессоустойчивости, опосредованной антагонизмом с фитопатогенными микроорганизмами, и, в итоге – сложному, разнообразному гомо- и гетерологичному противовирусному (и не только) эффекту сибирских растений на врожденный тренированный иммунитет аборигенов, а возможно и реинкарнации теории «старых друзей» с контролем структуры бактериома человека в целом, и, в конечном итоге – формированию иммунобиографии человека.

Таким образом, диссертационная работа Е.И. Филипповой посвящена несомненно высоко актуальной проблеме современной вирусологии - поиску новых источников биологически активных субстратов растений, культивируемых и дикорастущих на территории Юго-Западной Сибири, обладающих противовирусным действием, а также расширению уже существующей базы фармакопейных лекарственных растений.

Для достижения заявленной автором цели сформулированы следующие задачи:

1. Провести сравнительное исследование противовирусной активности экстрактов, полученных разными способами извлечения биологически активных веществ из растений, культивируемых и дикорастущих на территории Юго-Западной Сибири, в культуре клеток MDCK в отношении вируса гриппа A/H3N2 и A/H5N1.
2. Определить эффективность растительных экстрактов, проявивших противовирусную активность *in vitro*, на модели экспериментальной летальной гриппозной инфекции у аутбредных мышей популяции ICR.
3. Определить ингибирующие свойства образца, полученного на основе суммы флавонолов из надземных органов манжетки обыкновенной, и образцов, полученных из её подземных частей и состоящих в основном из катехинов и лейкоантоцианов, в отношении вируса гриппа А в культуре клеток MDCK и в отношении вирусов простого герпеса и ортопоксвирусов в культуре клеток Vero.
4. Исследовать предполагаемые механизмы действия образцов, полученных из манжетки обыкновенной, на вирус гриппа в системе *in vitro*.
5. Изучить токсические и протективные свойства образцов из манжетки обыкновенной в экспериментах на аутбредных мышах популяции ICR в отношении вируса гриппа А субтипов H3N2 и H5N1.
6. Определить противовирусную активность экстракта культуры «бородатых корней» селитрянки Шобера в отношении вируса гриппа A/H3N2 и A/H5N1 *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна, достоверность результатов и выводов

Общая характеристика работы, отраженная во введении, содержит убедительную аргументацию бесспорной научной новизны выполненного исследования.

Диссертантом впервые проведен масштабный скрининг противовирусных свойств экстрактов из культивируемых и дикорастущих на территории Юго-Западной Сибири растений в их максимально переносимых для культуры клеток MDCK концентрациях (0,005 – 4,0 мг/мл), позволяющий выявить перспективные виды для создания фитопрепаратов, обладающих противогриппозной активностью.

Впервые установлено, что образцы, полученные из надземных органов и корней манжетки обыкновенной, содержащие сумму флавонолов или катехинов и лейкоантоцианов, обладают противовирусной активностью в отношении вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) и A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) в культуре клеток MDCK, а также вируса простого герпеса 1 и 2 типов и ортопоксвирусов (вируса осповакцины и оспы мышей) в культуре клеток Vero.

Автором впервые доказано противовирусное действие образцов, полученных из надземных органов и корней манжетки обыкновенной, при экспериментальной гриппозной инфекции и у аутбредных мышей популяции ICR, при этом в

экспериментах на аутбредных мышах ICR, зараженных вирусом гриппа А субтипов H3N2 и H5N1 в дозе 10 ЛД₅₀, впервые определены 50 %-е (ЭД₅₀) и 100 %-е эффективные дозы (ЭД₁₀₀) образца из корней манжетки обыкновенной.

Впервые установлено также, что образец, полученный из корней манжетки обыкновенной и состоящий из катехинов и лейкоантоцианов, в экспериментах *in vitro* в отношении вируса гриппа А/H5N1 ингибировал адсорбционную способность вируса и снижал количество вирусной РНК, но не обладал вирулицидным действием и не подавлял нейраминидазную активность вируса.

Автором в ходе выполненных исследований впервые обнаружена противовирусная активность экстракта культуры «бородатых корней» селитрянки Шобера в отношении вируса гриппа А субтипов H3N2 и H5N1 *in vitro* и *in vivo*.

Работа выполнена на большом лабораторном и экспериментальном материале, высоком методическом уровне; автором применен широкий спектр современных вирусологических и молекулярно-биологических методов исследования.

Автором использованы также адекватные методы статистического анализа, включающие методы описательной, сравнительной и аналитической статистики позволившие провести корректную оценку полученных данных, что обеспечивает достоверность сделанных на их основе заключений и выводов.

Практическая значимость диссертации безусловна и определяется, в первую очередь тем, что установлены новые растительные источники веществ, обладающие выраженной противогриппозной активностью, с возможностью использования полученных новых научных данных для дальнейшего изучения лечебного и профилактического эффекта растений Юго-Западной Сибири, которые могут быть использованы в качестве сырьевой базы для разработки отечественных противовирусных препаратов

По материалам диссертации опубликовано 12 статей в журналах списка, рекомендованного ВАК Минобразования и науки РФ. Результаты работы защищены 2 патентами РФ: 1. Противовирусное средство на основе суммы флавоноидов из *Alchemilla vulgaris* L.: пат. 2580304 Рос. Федерация: МПК А61К 36/73 В01D 11/02 А61Р 31/12 А61Р 31/14 А61Р 31/16 А61Р 31/20 А61Р 31/22/ Н.А. Мазуркова, Т.А. Кукушкина, Е.И. Филиппова, Ж.Б. Ибрагимова; заявитель и патентообладатель Гос. научн. Центр вирусол. и биотехнол. «Вектор». - № 2015106729/15; заявл. 26.02.15; опубл. 10.04.16, бюл. №10. – 15 с: ил.

2. Противовирусное средство на основе экстракта культуры «бородатых корней» (“hairy roots”) селитрянки Шобера (*Nitraria schoberi* L.): пат. 2615376 Рос. Федерация: МПК А61К 36/77 В01D 11/02 А61Р 31/12/ Н.А. Мазуркова, Е.И. Филиппова, М.А. Проценко [и др.]; заявители и патентообладатели Гос. научн. Центр вирусол. и биотехнол. «Вектор», Рос. акад. наук Сиб. отд-ние, Центр. сиб. ботан. сад. - № 2016110990; заявл. 24.03.16; опубл. 04.04.17, бюл. №10. – 17 с: ил.

Общая характеристика работы:

Рассматриваемая работа традиционна по своей структуре и оформлению, изложена на 186 страницах текста, содержит разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы. Список литературы включает 177 источников (57 отечественных, 120 зарубежных), из них 6% - публикации последних 5 лет, 54% - публикации старше 5 лет (до 10 лет), 40% - старше 10 лет. Диссертационная работа иллюстрирована 32 таблицами, 24 рисунками.

В целом, оформление работы соответствует требованиям, предъявляемым к работам подобного уровня. К замечаниям можно отнести относительно невысокую долю литературных источников, опубликованных в последние 5 лет, в то время как только в течение 2020 – 2021, на фоне пандемии коронавирусной инфекции, число исследований растительных образцов с противовирусным эффектом стремительно растет во всем мире (только по ограниченному поиску *antivirus plants 2020 – 2022* и *biologically active plants against Covid-19* в PubMed и Google Scholar предложено более 400 публикаций).

Цель исследования сформулирована достаточно четко и корректно.

Положения, выносимые на защиту, сформулированы грамотно.

В главе 1 (*Обзор литературы*) рассмотрены подробные характеристики препаратов растительного происхождения против вирусных инфекций, в том числе – в историческом контексте представлен ретроспективный обзор научного интереса к противовирусным лекарственным растительным средствам. В главе отражен перечень вирусных инфекций, для которых широко используются препараты растительного происхождения, а также – характеристика семейств растений из различных регионов планеты, для которых установлены различные виды терапевтической активности. Отдельно обсуждены темы применения экстрактов и веществ растительного происхождения против вируса гриппа (Orthomyxoviridae), вирусов герпеса (Herpesviridae), поксвирусов (Poxviridae), вируса иммунодефицита человека (Retroviridae) и ряда других вирусов (коронавируса, этиологического фактора SARS; VSV и ВЭБ; HBV и HCV; энтеровируса 71; вируса Денге и др.). Выполнен анализ литературных данных эффективности отдельных семейств растений (бобовых (Fabaceae); сложноцветных (Asteraceae); розоцветных (Rosaceae); губоцветных (Lamiaceae); гречишных (Polygonaceae); селитрянковых (Nitrariaceae)), их экстрактов и биологически активных веществ при вирусных инфекциях.

Обзор литературы по форме и содержанию написан грамотно с хорошим анализом затронутых аспектов, касающихся конкретных заявленных тем диссертации, ясным изложением деталей проблем, что свидетельствует о высоком теоретическом уровне подготовки диссертанта, способного свободно и просто интерпретировать материалы предшествующих исследований. Обзор литературы хорошо структурирован и логичен, заявленные автором задачи диссертационной работы концептуально едины с содержанием данной главы. Замечаний по обзору литературы нет.

Во второй главе диссертации приведены сведения о примененных в диссертационной работе материалах и методах; подробная информация относительно использованного растительного сырья и образцов, культур клеток, лабораторных животных, штаммов и клонов вирусов (получены из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), методов оценки активности и концентрации вирусов.

Материалом для получения и изучения водных и этанольных экстрактов служило растительное сырье высших растений 84 видов 48 родов из 15 ботанических семейств, собранных в фазу цветения на территории Западной Сибири. В работе использовали также образцы на основе суммы флавоноидов из надземных и подземных частей манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L.), собранной на Семинском перевале Горного Алтая в фазу бутонизации – начала цветения. В экспериментах использовали культуру «бородатых корней» селитрянки Шобера (*Nitraria schoberi* L.).

В экспериментальной части работы использовали перевиваемые культуры клеток MDCK (клетки почки кокер-спаниеля) и Vero (клетки почки зеленой мартышки) из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Исследования токсичности и противовирусной активности растительных образцов *in vivo* проводили на аутбредных мышцах ICR, самцах и самках, из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», с последующим морфологическим, вирусологическим исследованием аутопсийных препаратов. В качестве референс-препаратов применены коммерческие противогриппозные препараты Тамифлю (Ф. Хоффманн - Ля Рош Лтд., Швейцария), Римантадин (ОАО «Дальхимфарм», Россия) и Ацикловир (ПФК АО, Россия), а также субстанции озельтамивир карбоксилат (Sequoia Research Products Ltd., США) и занамивир (Sigma-Aldrich, США).

В работе использовали штаммы ВГ А: штамм ВГ птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и адаптированный к лабораторным мышам штамм ВГ человека A/Aichi/2/68 (H3N2); ортопоксвирусы: вирус осповакцины (ВОВ, штамм Л-ИВП) и вирус оспы мышей - экстремелии (ВОМ, штамм К-1); а также вирусы простого герпеса (ВПГ): 1-го (ВПГ-1, штамм VR-3) и 2-го (ВПГ-2, штамм MS) типов. Вирусы нарабатывали: ВГА в 10-суточных развивающихся куриных эмбрионах; ортопоксвирусы и герпетические вирусы - в культуре клеток Vero в среде DMEM.

Для определения в исследуемых экстрактах флавонолов, катехинов и танинов применили спектрофотометрический метод; токсичность растительных образцов и их противовирусную активность в отношении РНК- и ДНК-содержащих вирусов изучили на культурах клеток MDCK и Vero; наличие вирусов в среде культивирования при нескольких схемах введения оценивали по реакции гемагглютинации (РГА) с 1% суспензией эритроцитов кур. Для оценки цитопатогенного эффекта вирусов на фоне воздействия растительными образцами применили электронную микроскопию; действие растительных образцов на синтез РНК вирусов изучали с помощью полуколичественной RT-PCR специфической

(геномной и матричной) РНК, на активность нейраминидазы ВГА – с помощью флуоресцентного метода.

Т.о., использованные автором в работе лабораторные, экспериментальные, молекулярно-генетические и статистические методы исследования многочисленны, разнообразны, современны и информативны, применены к достаточному объему наблюдений в динамике. Представление собственных материалов диссертант осуществляет так же логично и последовательно, как и данных литературы, в строгом соответствии с целью и задачами работы.

3-я глава «Результаты и обсуждение», посвященная результатам собственных исследований – основная глава диссертации, содержит данные проведенных исследований и их интерпретацию.

Раздел 3.1 отражает первичный скрининг противовирусной активности растительных экстрактов дикорастущих и культивируемых растений флоры Юго-Западной Сибири в отношении вируса гриппа в культуре клеток MDCK

На первом этапе основной задачей автора было выявление растений, культивируемых и дикорастущих на территории Новосибирской области, перспективных для создания фитопрепаратов, обладающих противовирусной активностью в отношении вируса гриппа А, для чего исходно изучили токсические свойства большого списка полученных экстрактов растений на перевиваемой культуре клеток MDCK с определением МПК (максимально переносимой концентрации). Из 122 исследованных растительных экстрактов были выделены наиболее – наименее токсичные. Наименьшую токсичность проявили этанольные растительные экстракты видов растений следующих семейств: Rubiaceae – мареновые (МПК = 0,5 мг/мл), Scrophulariaceae – норичниковые (МПК = 0,3-1,0 мг/мл), Plantaginaceae – подорожниковые (МПК = 1,0 мг/мл), а также водные и этанольные экстракты большинства видов Lamiaceae – губоцветные (МПК = 0,5-2,0 мг/мл) и большинства видов Fabaceae – бобовые (МПК = 0,5-4,0 мг/мл)

В дальнейшем исследовали противовирусную активность водных и этанольных экстрактов, полученных из надземных и подземных частей растений, в перевиваемой культуре клеток MDCK в отношении двух штаммов ВГ А/Aichi/2/68 (H3N2) и А/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1). Высокая активность (ИН \geq 2,0 lg) против ВГ человека была обнаружена в этанольных экстрактах 13 видов (манжетки обыкновенной, репейника волосистого, гравилата речного, спиреи иволистной, средней, зверобоелистной, даурской, березолистной, пушистой, вероники Крылова, монарды дудчатой, шалфея лекарственного, дербенника лозного) 8 родов из 4 семейств (15,9 %), при этом только против ВГ А/H5N1 были высокоактивны этанольные экстракты 23 видов (манжетки обыкновенной, репейника волосистого, гравилата речного, спиреи иволистной, средней, пушистой, зверобоелистной, извилистой, даурской, городчатой, березолистной, водосборолистной, альпийской, дербенника лозного, пажитника плоскодонного, астрагала сладколистного, чины

весенней, вероники Крылова, монарды дудчатой, иссопа лекарственного, шалфея лекарственного, полыни горькой и обыкновенной) 13 родов из 6 семейств (28,0 %).

Сравнительный анализ противовирусной активности в отношении каждого из субтипов ВГ этанольных и водных экстрактов растений 11 видов 10 родов, из семейств розоцветных, бобовых и губоцветных позволил прийти к выводу, что проявление противовирусной активности этанольных и водных экстрактов растений зависит от таксономической принадлежности вида растения и его части, используемой для извлечения.

На следующем этапе автором было исследовано влияние концентрации наиболее активных растительных экстрактов на инфекционность ВГ А субтипов H3N2 и H5N1 в культуре клеток MDCK и показано, что титры вирусов снижаются с увеличением концентрации экстрактов (применены экстракт манжетки обыкновенной (надземная часть), экстракт спиреи иволистной (листья), экстракт репейничка волосистого (надземная часть), экстракт репейничка волосистого (корни), экстракт монарды дудчатой (надземная часть), экстракт иссопа лекарственного (надземная часть), экстракт шалфея лекарственного (листья)).

При изучении влияния этанольных растительных экстрактов на инфекционность (титр) ВГ в культуре клеток MDCK при внесении экстрактов за 1 ч до, одновременно и через 1, 3, 6 и 24 ч после заражения клеток ВГ в различных разведениях и в сравнении с Тамифлю и Римантадином, автором установлено, что экстракт манжетки обыкновенной снижает инфекционность ВГ A/Aichi/2/68 (H3N2) и A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) в культуре клеток MDCK при его внесении за 1 ч до, одновременно и через 1, 3 и 6 ч после заражения. Экстракт спиреи иволистной оказывает ингибирующее влияние на инфекционность ВГ А/H3N2 при внесении образца за 1 ч до, одновременно и через 1 ч после инфицирования, а на инфекционность ВГ А/H5N1 – только при внесении образца за 1 ч до заражения и одновременно. Оба экстракта на основе репейничка волосистого, его надземной и подземной частей, ингибируют инфекционность ВГ А/H3N2 при добавлении экстрактов за 1 ч до заражения и одновременно, а инфекционность ВГ А/H5N1 – при добавлении этих экстрактов за 1 ч до, одновременно и через 1, 3 и 6 ч после заражения. Экстракты монарды дудчатой и шалфея лекарственного снижают инфекционность ВГ А/H3N2 при их внесении за 1 ч до, одновременно и через 1 и 3 ч после заражения, а инфекционность ВГ А/H5N1 при добавлении образцов за 1 ч, одновременно и через 1, 3 и 6 ч после заражения.

Вирулицидное действие в отношении ВГ А/H3N2 (снижение титров вируса под действием образцов на 3,50; 3,17; 3,17; 3,50; 3,50 и 3,34 lg) установлено для этанольных экстрактов из манжетки обыкновенной, спиреи иволистной, надземной части и корней репейничка волосистого, монарды дудчатой и чины весенней, а в отношении ВГ А / H5N1 – образцов из спиреи иволистной, иссопа лекарственного, шалфея лекарственного, чины весенней, и надземной части и корней репейничка

волосистого (снижение титров ВГ на 0,66; 1,00; 1,33; 3,00; 1,16; 3,00 Ig соответственно).

Расчет индекса селективности (SI) для экстрактов с противовирусным эффектом позволил автору установить, что целый перечень растительных водных и этанольных экстрактов демонстрировал высокую вирус-ингибирующую активность, при этом наибольшую активность в отношении ВГ А субтипа H3N2 проявляли водные экстракты манжетки обыкновенной (7W), монарды дудчатой (14W) и шалфея лекарственного (16W), IC₅₀ которых составили 5,0; 9,3 и 9,3 мкг/мл соответственно, а в отношении ВГ птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) - водные экстракты монарды дудчатой (14W) и корней манжетки обыкновенной (59W), а также этанольный экстракт репейника волосистого (13E) (9,3; 5,0 и 7,8 мкг/мл соответственно).

В разделе 3.2 выполнено изучение токсичности и противовирусной активности растительных экстрактов в экспериментах на лабораторных мышах, инфицированных вирусом гриппа, в сравнении с официальными лекарственными средствами (Тамифлю)

При изучении противовирусной активности образцов автором было установлено, что из 16 исследованных этанольных экстрактов защитный эффект (по доле выживших животных, инфицированных ВГ А/H3N2) проявляли 2 образца, полученные на основе спиреи иволистной и полыни горькой (коэффициент защиты обоих экстрактов составил 70 %), при этом увеличение средней продолжительности жизни инфицированных мышей наблюдалось при введении мышам экстрактов 7 растений: полыни горькой, полыни обыкновенной, спиреи иволистной, иссопа лекарственного, монарды дудчатой, репейника волосистого (корни) и манжетки обыкновенной (корни). Для мышей, инфицированных вирусом A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1), защитный эффект по коэффициенту защиты оказали 2 группы образцов: для экстрактов из репейника волосистого (наземная часть), гравилата речного и полыни обыкновенной КЗ составил 50 %, для экстрактов из спиреи иволистной, иссопа лекарственного и полыни горькой - 70 %.

Параллельно в эксперименте по исследованию противовирусной активности растительных образцов автором была изучена их токсичность: признаков интоксикации у животных выявлено не было - введение растительных образцов в разовой дозе 12,5 мкг/г 2 раза/сут в течение 5 сут не приводило к изменению внешнего вида, подвижности животных, потребления ими пищи и воды в течение 16 сут наблюдения.

В разделе 3.3 представлено изучение качественного состава и количественного содержания биологически активных веществ в растительных экстрактах, проявивших выраженную противовирусную активность

Автором исследован качественный состав и количественное содержание фенольных соединений, представленных флавонолами, катехинами и танинами, в растительных экстрактах, проявивших значительную противовирусную активность в

отношении ВГ в экспериментах на культуре клеток и мышах аутбредной линии ICR. Самое большое количество флавонолов было обнаружено в сухом экстракте из надземной части монарды дудчатой; катехинов - в экстракте спиреи иволистной; танинов - в надземной части всех трех представленных видов, при этом в надземной части репейника волосистого танинов было в 1,5 раза больше, чем в корнях.

Автором уточнено, что в экстракте из надземной части манжетки обыкновенной содержится не менее 21 соединения, из них идентифицированы 6; в экстракте из листьев спиреи иволистной содержится не менее 27 соединений, из которых идентифицированы 16; в экстрактах из надземной части и корней репейника волосистого содержится не менее 20 и 15 соединений, а идентифицировано 8 и 7 соответственно; в экстракте из надземной части монарды дудчатой содержится не менее 22 соединений, из которых идентифицированы 2; и, наконец, в экстракте листьев шалфея лекарственного содержится не менее 20 фенольных соединений, идентифицирован только флавонол лютеолин, - все это отражает большой объем неизведанных данных, требующих дальнейшего изучения.

Таким образом, изучение противовирусной активности водных и этанольных экстрактов из 83 видов дикорастущих и культивируемых на территории Западной Сибири растений позволило автору установить новые источники БАВ, обладающие выраженной противогриппозной активностью (монарда дудчатая, шалфей лекарственный, манжетка обыкновенная, репейник волосистый, гравилат речной, спирея иволистная, полынь горькая, полынь обыкновенная, иссоп лекарственный).

В разделе 3.4 представлены результаты изучения противовирусной активности и механизма действия образцов, полученных из манжетки обыкновенной разными способами

Для дальнейшего более детального изучения противовирусных свойств автором была выбрана манжетка обыкновенная (*Alchemilla vulgaris*). По мнению автора, манжетка обыкновенная, благодаря широкому спектру биологической активности, является потенциально перспективным объектом изучения официальной медициной, для ее экстрактов установлена значительная противовирусная активность в экспериментах *in vitro* и *in vivo* в отношении ВГ. Из надземной и подземной частей манжетки обыкновенной в лаборатории фитохимии Центрального сибирского ботанического сада Сибирского отделения Российской академии наук (ЦСБС СО РАН, г. Новосибирск) были выделены биологически активные препараты на основе суммы флавоноидов: препараты № 5 и № 6 - сухие этилацетатные экстракты из корней, состоящие в основном из катехинов и лейкоантоцианов ($70,0 \pm 3,5$ %); препарат № 7 - сухой этанольный экстракт из надземной части растения, состоящий из суммы флавоноидов ($71,0 \pm 3,6$ %), из которых идентифицированы рутин, авикулярин, кверцетин, кемпферол и (-)-катехин.

На первом этапе данной фазы исследования (подраздел 3.4.1 - *Изучение противогриппозной активности и механизма действия образцов, полученных разными способами из манжетки обыкновенной*) автором были изучены токсические свойства полученных экстрактов манжетки обыкновенной в перевиваемой культуре клеток MDCK, для каждого экстракта была определена МПК. Все изученные экстракты оказались малотоксичными, все они одновременно снижали титры ВГ A/Aichi/2/68 (H3N2) относительно контроля и подавляли репродукцию вируса A/H5N1 в клетках MDCK.

Интересно, что значения индексов селективности (SI) для образцов № 5 и №6 (из корней) были в 1,6-3,7 раз выше значений SI для образца № 7, и в 3,6-7,4 раза выше значений SI для экстракта 7E из надземных органов манжетки обыкновенной. Этот вывод был подтвержден для двух разных штаммов ВГ A/Aichi/2/68 (H3N2) и A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1).

Влияние препаратов манжетки обыкновенной на размножение ВГ A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) в культуре клеток MDCK оценивали с помощью просвечивающей электронной микроскопии, результаты которой представлены в диссертационной работе серией убедительных снимков ультратонких срезов с контрастированием уранилацетатом и цитратом свинца. Автором показано, что в ультратонких срезах клеток культуры MDCK, зараженных ВГ A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и обработанных препаратом манжетки обыкновенной № 5 в дозе 0,25 мг/мл, морфологических признаков размножения вируса не определяли, характерные вирусные включения в обработанных растительным препаратом образцах отсутствовали и в ядре, и в цитоплазме. Ультратонкие срезы клеток культуры MDCK, зараженной ВГ, и обработанной препаратом манжетки обыкновенной № 7 в дозе 0,25 мг/мл, выявили единичные клетки с морфологическими признаками размножения вируса, но число таких клеток было невелико, признаков формирования дочернего вируса отмечено не было, при этом одновременно установлено снижение деструктивных изменений в культуре.

Изучение протективных свойств препаратов в отношении ВГ на лабораторных мышках в сравнении с Тамифлю и контролем позволило автору установить, что п/о введение животным образцов №№ 5, 6, 7 и 7E в разовой дозе 12,5 мкг/г массы животного в объеме 0,2 мл (суточная доза - 25 мкг/г массы) за 1 ч д.з. и далее в течение 5 сут п.з. ВГ A/Aichi/2/68 (H3N2) (10 ЛД₅₀) защищало 60, 50, 30 и 10 % животных соответственно; а с ВГ A/chicken/Kurgan/05/2005 защищало от гибели 64; 55; 45; 27 и 64 % животных соответственно при 100 % гибели мышей в контроле (без препарата).

Автором было убедительно показано, что при введении образцов на основе суммы флавоноидов манжетки обыкновенной по лечебно-профилактической схеме мышам, зараженным данными штаммами ВГ, увеличивалась средняя продолжительность жизни инфицированных мышей по сравнению с соответствующим контрольным значением - при введении образца № 5 - до 80 %, образцов № 7 и 7E - до 50 % (при 20% в контроле).

Аутопсийные исследования позволили подтвердить, что титры вируса в гомогенатах легких мышей при введении препаратов манжетки обыкновенной были существенно ниже, чем в контроле (однако препарат сравнения Тамифлю проявил большую противовирусную активность, согласно данным исследования гомогенатов).

В дальнейших экспериментах на лабораторных животных (мыши) автором были изучены более детально параметры токсичности образца № 5, как более эффективного из 2-х препаратов манжетки – установлено, что п/о введение препарата в дозе 1000 мг/кг массы мыши (1/5 от ЛД₅₀) не оказывало существенного влияния на внешний вид и поведение животных, не вызывало изменений интегральных физиологических показателей, массы тела экспериментальных животных, а также массы и макроскопической картины внутренних органов; одновременно автором были установлены 50 и 100% эффективные дозы (ЭД₅₀ и ЭД₁₀₀) препарата № 5 для аутбредных мышей ICR в отношении 2-х штаммов ВГ.

Вызывает интерес попытка автора изучить предполагаемые механизмы противовирусного действия образцов № 5 и № 7 на ВГ в системе *in vitro*.

Снижение инфекционной активности вируса гриппа A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) при обработке ВГ (100 ТЦД₅₀) препаратами № 5 и № 7 в максимально переносимых концентрациях (МПК = 250 мкг/мл) в течение 30 мин при комнатной температуре д.з. монослоя культуры клеток MDCK на 1,17 и 1,50 lg соответственно, отражало противовирусную активность образцов, при этом существенного снижения титра вируса в их присутствии не происходило, что не позволяло, по мнению автора, расценивать эффект как проявление вирулицидной активности. Ингибирование гемагглютинации ВГ с эритроцитами петуха под действием различных концентраций препарата показало, что образец № 5 из корней *A. vulgaris*, при высоких концентрациях (250-2000 мкг/мл) вызывает дозозависимое торможение адсорбции ВГ А субтипов H5N1 и H3N2, однако полного ингибирования адсорбционной способности (или гемагглютинации) исследуемых штаммов ВГ не наблюдалось ни при каких используемых концентрациях препарата. Не подтвердилось и предположение о возможной способности исследуемых образцов оказывать ингибирующее действие на нейраминидазную активность - значения концентраций образцов № 7 и № 5, необходимых для снижения нейраминидазной активности ВГ А/H5N1 на 50 % (IC₅₀), превышали значения IC₅₀ озельтамивира в 330 000 и 366 000 раз соответственно, а занамивира - в 1 049 000 и 1 165 000 раз соответственно.

В тоже время, оценка количества вирусной РНК при помощи метода полуколичественной RT-PCR в инфицированных клетках MDCK позволила выявить уменьшение количества РНК не менее чем в 2 раза относительно контроля под действием образца № 5 (из корней), при всех использованных концентрациях (62,5, 125, 250 и 500 мкг/мл), а под действием образца № 7 (из надземной части), и Тамифлю только при концентрациях 250 и 500 мкг/мл, демонстрируя, по мнению автора, свойство манжетки обыкновенной оказывать ингибирующий эффект на синтез РНК (геномной и матричной) ВГ. Дополнительная оценка влияния препаратов

манжетки обыкновенной на продукцию вируса гриппа в разное время после инфицирования клеток MDCK позволила автору установить, что при высоких концентрациях растительных образцов (от 62,5 до 250 мкг/мл) продукция вируса уменьшалась на 1,83-7,33 lg в зависимости от концентрации препаратов. Образец № 7 уменьшал продукцию вируса на 1,83 и 2,5 lg, а образец № 5 – на 1,83 и 3,16 lg при концентрациях 62,5 и 125,0 мкг/мл соответственно, и это значительное уменьшение наблюдалось во все периоды времени после инфицирования (8, 24 и 36 ч). Практически полное ингибирование продукции вируса наблюдали при самой высокой тестируемой концентрации (250 мкг/мл) исследуемых препаратов.

Т.о., ингибирование продукции ВГ под влиянием образцов № 5 и № 7 имело место не только после первичного заражения через 8 ч, но и при продукции вновь образуемых вирионов в последующие сроки после заражения клеток (24 и 36 ч). Тонкие механизмы данных противовирусных эффектов растительных образцов ждут дальнейшего изучения.

Подраздел 3.4.2 - *Изучение противоопенной активности образцов, полученных из манжетки обыкновенной* - посвящен следующему этапу анализа противовирусной активности препаратов манжетки обыкновенной.

Исследование проводили на клетках Vero в отношении ортопоксвирусов: вируса осповакцины (ВОВ) и вируса оспы мышей (ВОМ). Автором установлено, что противовирусный эффект в отношении ортопоксвирусов оказывали препараты № 5 и № 6, полученные из корней манжетки обыкновенной при использовании в качестве экстрагентов этилацетата и 70 % этанола, а также препарат № 7, полученный из надземной части растения путем этанольного извлечения. Во всех этих образцах найдено самое высокое содержание флавоноидов в пересчете на сухой препарат. Автором было показано, что с увеличением концентрации всех исследованных экспериментальных образцов манжетки обыкновенной имело место снижение титров ВОВ и ВОМ и соответственное увеличение индекса нейтрализации в отношении этих ортопоксвирусов, что перспективно для дальнейшего исследования противовирусной активности растительных средств в экспериментах на животных.

В подразделе 3.4.3 - *Изучение противовирусной активности образцов, полученных из манжетки обыкновенной, в отношении вируса простого герпеса в культуре клеток Vero* – автором продолжено исследование противовирусной активности препаратов манжетки обыкновенной в отношении ДНК-геномных вирусов другого семейства – Herpesviridae.

Было установлено, что препараты как из корней № 5 и № 6, так и № 7 из надземных органов манжетки обыкновенной, оказывали противовирусный эффект в отношении ВПГ-1 и ВПГ-2 (по данным индекса нейтрализации), при этом наиболее эффективными были образцы № 5 и, особенно, № 6, полученные из корней манжетки обыкновенной, при воздействии ими на ранних стадиях жизненного цикла ВПГ в

культуре клеток Vero (одновременно с заражением клеток вирусами или через 1 ч п.з.).

Т.о, результаты данного исследования позволили автору сделать вывод о том, что препараты, полученные из манжетки обыкновенной, обладают противовирусной активностью в отношении ВГ А в экспериментах на культуре клеток MDCK и на аутбредных мышах популяции ICR, а также в отношении ВПГ-1 и ВПГ-2 и ортопоксвирусов в культуре клеток Vero

*В разделе 3.5 представлены результаты изучения противовирусной активности экстракта культуры «бородатых корней» («hairy roots») селитрянки Шобера (*Nitraria schoberi*) в отношении вируса гриппа, в сравнении с Тамифлю*

Селитрянка Шобера выбрана автором для изучения противовирусной активности с учетом имеющихся литературных данных об исключительной биологической активности и лекарственных свойствах это растения. Исследование было проведено с этанольным экстрактом из культуры «бородатых корней» («hairy roots») селитрянки, которая, как известно, представляет собою важную биотехнологическую систему для индуцирования биоактивных соединений из растений. Культура была создана в ЦСБС СО РАН по ранее разработанной технологии; содержание вторичных метаболитов, таких как флавонолы, танины, катехины, пектины, протопектины и сапонины, в культуре «бородатых корней» значительно превышало количество тех же компонентов в образце, полученном из корней природного растения. Выполненный автором анализ состава экстракта культуры «бородатых корней» селитрянки Шобера позволил дополнительно идентифицировать галловую кислоту, \pm катехины и L-эпикатехин, при этом суммарное содержание катехинов в образце было больше в 3,8 раза, чем в контроле.

Согласно полученным автором данным, и экстракт селитрянки Шобера, и Тамифлю проявили значительный противовирусный эффект в отношении используемых в эксперименте штаммов ВГ, при этом индексы нейтрализации для ВГ А/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) под действием Тамифлю и экстракта селитрянки были равны 2,5 и 4,5 lg, тогда как для А/Aichi/2/68 (H3N2) составляли 2,17 и 2,67 lg соответственно. Обращают внимание и полученные автором данные об увеличении средней продолжительности жизни инфицированных ВГ А/Aichi/2/68 (H3N2) мышей при введении экстракта селитрянки Шобера и Тамифлю до $13,3 \pm 3,9$ и $11,4 \pm 3,4$ сут соответственно (в контроле - $6,1 \pm 0,9$ сут); аналогичные данные установлены и для мышей, инфицированных ВГ А/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) – увеличение СПЖ до $15,2 \pm 1,7$ и $13,2 \pm 3,6$ сут соответственно (при $8,0 \pm 1,3$ сут в контрольной группе).

Эти данные подтверждены автором и при помощи кривых выживаемости Каплана-Мейера: выживаемость мышей, инфицированных штаммом А/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1), при введении экстракта достоверно увеличивалась до 80 % ($p=0,00009$), а при введении Тамифлю – до 60 % ($p=0,002$), относительно значения (0 %) в контрольной группе; при введении экстракта и Тамифлю мышам, инфицированным штаммом

A/Aichi/2/68 (H3N2), получены равные данные выживаемости - до 60 % ($p=0,002$) в обеих группах, тогда как в контрольной группе выживаемость составляла 0 %.

Т. о, результаты этих весьма интересных исследований позволили автору сделать обоснованный вывод о том, что новый биотехнологический растительный продукт, полученный из культуры «бородатых корней» селитрянки Шобера, обладает выраженной противовирусной активностью в отношении ВГ А в культуре клеток MDCK и в экспериментах на мышах

Заключительная 4 короткая глава диссертации (Обсуждение результатов) посвящена представлению квинтэссенции полученных результатов – общему резюме диссертационной работы, которое написано интересно, конкретно, сжато, с привлечением литературных данных для сопоставления основных итогов выполненной работы с ранее опубликованными исследованиями других авторов, при этом автор обращает внимание на то, что исследований, посвященных противовирусным свойствам чины весенней, гравилата речного, полыни горькой и обыкновенной, монарды дудчатой, также как и селитрянки Шобера в литературе не найдено. Автором исследованы новые растительные источники БАВ, обладающие выраженной противогриппозной активностью, которые могут быть использованы в качестве сырьевой базы для фармацевтической промышленности России, с дальнейшей разработкой и внедрением в производство на их основе новых эффективных противовирусных фитопрепаратов широкого спектра действия.

Завершают диссертацию выводы, которые соответствуют поставленным задачам, суммируют главные результаты исследования и свидетельствуют о достижении цели работы.

Основные результаты исследования в достаточной степени представлены в печатных изданиях; в полной мере отражены в автореферате.

Подводя итог оценке диссертационного исследования Е.И. Филипповой, следует отметить, что работа выполнена полностью в соответствии с поставленными целями и задачами.

Замечаний по содержанию и оформлению диссертации нет.

Считаю необходимым отметить, что диссертационная работа Е.И. Филипповой расширяет представления о противовирусном потенциале соединений природного происхождения региона Юго-Западной Сибири, открывает новые перспективы поиска биоактивных метаболитов лекарственных растений и создания новых лекарственных средств с мощной противовирусной активностью, а также, выходя за рамки сформулированных выводов, позволяет продолжать исследования влияния сибирских лекарственных растений уже на врожденные противовирусные защитные механизмы человеческого организма, которые представляют собою сложную и малоизученную систему.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Филипповой Екатерины Игоревны на тему «Противовирусные свойства экстрактов и фенольных соединений культивируемых и дикорастущих растений Юго-Западной Сибири», представленная на соискание степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.10 – вирусология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненного автором исследования содержится решение актуальной научной задачи – поиск новых источников биологически активных субстратов растений, культивируемых и дикорастущих на территории Юго-Западной Сибири, обладающих противовирусным действием, с расширением уже существующей базы фармакопейных лекарственных растений.

Работа Филипповой Екатерины Игоревны по актуальности, научной новизне, практической значимости, полноте изложения и обоснованности выводов полностью соответствует требованиям пп. 9 – 14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 (с изменениями в ред. Постановления Правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016, №748 от 02.08.2016, №650 от 29.05.2017, №1024 от 28.08.2017, №1168 от 01.01.2018, №426 от 20.03.2021), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – вирусология.

доктор медицинских наук,
доцент, профессор кафедры
инфекционных болезней
педиатрического факультета
ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России
E.mail: izvekova@inbox.ru
Дата: 05.05.2022 г.

И.Я. Извекова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
Адрес: 630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52.
Тел. 8 (383) 222-32-04

Подпись Извековой И.Я. заверяю:
должность, дата

Ф.И.О.

