

ОТЗЫВ

официального оппонента Ленёвой Ирины Анатольевны, доктора биологических наук на диссертационную работу Волобуевой Александрины Сергеевны на тему: «Характеристика противовирусной активности новых гетероциклических соединений в отношении вирусов рода *Enterovirus*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология

Актуальность темы диссертации

Вирусы рода *Enterovirus* (полиовирусы, неполиомиелитные энтеровирусы и риновирусы) являются возбудителями заболеваний человека с широким спектром клинических проявлений, среди которых чрезвычайно опасное острое вирусное заболевание, вызываемое полиовирусами. Регулярно во всем мире регистрируют вспышки энтеровирусной инфекции. Риновирусы являются важным этиологическим агентом ОРВИ. Для этих вирусов характерно высокое генетическое и серологическое разнообразие, поэтому разработка универсальных вакцин для профилактики энтеровирусных и риновирусных инфекций затруднена. В РФ вакцинопрофилактика доступна только для полиомиелита. Для лечения пациентов с энтеровирусными и риновирусными инфекциями используют иммунокорригирующие, патогенетические и симптоматические лекарственные средства. Следует отметить, что в последние годы наблюдается бум в разработке препаратов против вирусных инфекций. Если прошлый век назывался веком антибиотиков, то настоящий век по праву можно назвать веком противовирусных препаратов. К наиболее впечатляющим успехам химиотерапии вирусных инфекций безусловно можно отнести разработку комбинированной терапии ВИЧ инфекции, превратившей ее из смертельной болезни в хроническую при условии постоянного приема препаратов. Другим достижением является открытие и внедрение в практику этиотропной терапии против гепатита С, результатом которой является элиминация вируса в организме. Бесспорные успехи достигнуты при применении химиопрепаратов для лечения гриппозной инфекции. Тем не менее, на сегодняшний день в мире по-прежнему отсутствуют зарегистрированные этиотропные препараты для терапии инфекций, вызываемых вирусами рода

Enterovirus. В связи с этим актуальность диссертации Волобуевой А.С. целью которой является поиск новых ингибиторов жизненного цикла вирусов рода *Enterovirus* среди новых синтезированных гетероциклических соединений разных групп, не вызывает сомнений.

Научная новизна полученных результатов и выводов

В данной работе автором впервые изучены противовирусные свойства соединений групп лейковердазилов и вердазилов и показан высокий вирус-ингибирующий потенциал лейковердазилов. Впервые исследован их эффект на различные стадии вирусной и показано, что наибольшая активность соединения-лидера из группы лейковердазилов наблюдается при его добавлении в культуру клеток до начала репликации вирусного генома. Впервые получен и охарактеризован штамм вируса Коксаки, устойчивый к указанному соединению-лидеру, в его геноме картированы мутации в гене многофункционального белка 2С, сопровождающиеся снижением скорости репродукции вируса в культуре клеток.

В группе аналогов плеконарила автором выявлено новое соединение с широким спектром вирус-ингибирующей активности, в том числе и в отношении плеконарил-устойчивого штамма вируса Коксаки. Указанное соединение обладало протективной активностью на модели энтеровирусного панкреатита у мышей. Автором получен штамм вируса Коксаки, резистентный к указанному аналогу плеконарила, показаны его сниженные ростовые характеристики, при этом в его геноме картированы новые мутации в генах белков VP1 и VP3.

Практическая значимость работы

Полученные автором работы сведения о биологической активности исследованных новых химических соединений (аналогов плеконарила, производных бензолсульфамидов, вердазилов и лейковердазилов) будут полезны для пополнения баз данных программных продуктов, реализующих методы исследований *in silico*. Информацию о выявленных новых сайтах в вирусных белках VP1, VP3, 2С, замены в которых сопровождаются снижением ростовых свойств вируса, можно использовать при дизайне мишень-ориентированных

ингибиторов репродукции энтеровирусов. Несомненный практический интерес для проведения дальнейших исследований представляет новый аналог плеконарила, обладающий протективной активностью *in vivo*.

Степень обоснованности и достоверности представленных положений и выводов

Диссертационное исследование выполнено на современном экспериментальном уровне. Достоверность полученных результатов определяется большим объемом проведенной экспериментальной работы, использованием разнообразных классических и современных методов исследования, а также адекватно подобранным методами статистической обработки биологических данных. Положения, выносимые на защиту, являются обоснованными. Выводы диссертации сформулированы в соответствии с полученными результатами и согласуются с поставленными при проведении исследования задачами. Результаты диссертационной работы Волобуевой А.С. представлены в 5 статьях, опубликованных в ведущих отечественных и международных научных изданиях, и 1 патенте на изобретение в РФ. Материалы диссертации были представлены в форме докладов на 10 российских и международных научных конференциях.

Проведенное исследование является оригинальным, завершенным в рамках поставленной цели и задач научно-квалификационным трудом, соответствует паспорту специальности 1.5.10. Вирусология, пунктам 4, 10 и 11.

Строение и структура диссертационной работы

Диссертационная работа построена по классической схеме и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты, обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и условных обозначений, список литературы и 5 приложений. Работа изложена на 175 страницах, иллюстрирована 46 рисунками и 18 таблицами. Список литературы включает 155 источников.

В разделе «Введение» изложены актуальность и степень разработанности темы исследования, цель и задачи исследования, научная новизна полученных

результатов и их теоретическая и практическая значимость, методология исследования, положения, выносимые на защиту, и информация о публикациях и апробации результатов.

В разделе «Обзор литературы» дано современное представление о биологии энтеро- и риновирусов и их роли в инфекционной патологии человека. Автором приводится подробное описание состояния разработки этиотропных средств для лечения заболеваний, вызываемых вирусами рода *Enterovirus*, приводятся количественные показатели активности ингибиторов структурных и неструктурных белков этих вирусов. Обзор легко читается, достаточно полно освещает практически все проблемы, затронутые в диссертации. Глава «Материалы и методы исследований» содержит подробное описание реагентов, материалов и разнообразных классических вирусологических и современных молекулярно-биологических методов, использованных автором в работе. Выбранные подходы и методики соответствуют поставленным задачам. Центральной частью работы является глава «Результаты», которые состоят из 4 разделов, соответствующих положениям, выносимым на защиту и обосновывающих их. На первом этапе работы было показано наличие цитопротективной активности *in vitro* в условиях инфицирования вирусом Коксаки В3 у соединений, относящихся к группам лейковердазилов, аналогов плеконарила и производных бензолсульфамидов. Кроме того, 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 соединений и определить leader – и далее hit-молекулы среди соединений каждого ряда.

Далее была проведена оценка вирусингибирующей активности соединений-лидеров в каждой группе в отношении следующих вирусов рода *Enterovirus*: вирусы Коксаки В3, В4, В5, ЕСНО3, ЕСНО30, Коксаки А16, А21, риновирус 14 типа. Наиболее широким спектром действия обладало соединение-лидер из группы аналогов плеконарила, N,N-диметил-5-[3-[2-метил-

4-[5-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-3-л]феноксипропил]изоксазол-3-карбоксамид, которое ингибировало репродукцию широкого спектра вирусов рода *Enterovirus*, включая резистентный к плеконарилу штамм вируса Коксаки В3. Для соединения-лидера из группы лейковердазилов была показана активность в отношении всех использованных штаммов вирусов, за исключением риновируса. Соединения-лидеры из группы бензолсульфамидов были наиболее активными только в отношении вирусов Коксаки В.

Было показано, что указанный аналог плеконарила и соединения из группы бензолсульфамидов относятся к группе капсид-связывающих агентов и действуют на вирус на ранних стадиях жизненного цикла. Соединение-лидер из группы лейковердазилов не является капсид-связывающим агентом, не обладает вирулицидным действием и ингибирует воспроизводство вируса при добавлении к инфицированным клеткам не позже точки 4 часа после заражения.

На следующем этапе работы исследовали активность соединений-лидеров *in vivo* на модели энтеровирусного панкреатита, вызванного внутрибрюшинным введением вируса Коксаки В5 у самцов мышей BALB/c. В экспериментах *in vivo* только применение аналога плеконарила, в отличие от остальных соединений-лидеров, приводило к снижению вирусной нагрузки в поджелудочной железе по сравнению с группой плацебо, что свидетельствует о перспективности проведения доклинических исследований данного соединения. На заключительном этапе работы была исследована возможность выработки резистентности к указанному аналогу плеконарила и соединению-лидеру из группы лейковердазилов. В ходе работы была проведена селекция резистентных штаммов вируса Коксаки В3, локализованы аминокислотные замены в вирусных белках 2С, VP3, VP1, показано, что полученные резистентные штаммы имеют сниженные ростовые свойства.

Все результаты, полученные автором, обработаны статистически, трактуются однозначно и не вызывают сомнений в их достоверности, изложены четко и логично, представлены последовательно, проиллюстрированы в графическом или табличном формате.

Обсуждение результатов вынесено в отдельную главу, в которой автор

дает критическую оценку полученным результатам выполненной работы, проводя их сравнительный анализ с опубликованными ранее исследованиями других научных групп.

В главах «Заключение» и «Выводы» автор кратко суммирует основные результаты диссертационного исследования и показывает выполнение поставленных задач. Также приводятся практические рекомендации применения полученных результатов и перспективы дальнейшей разработки темы.

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 и содержанию можно отметить следующие:

1. В работе есть неточность использования некоторых терминов. В опытах *in vivo* был использован термин протективная активность, которая обычно применяется при использовании летальной животной модели, в используемой Вами нелетальной модели энтеровирусного панкреатита мышей на мой взгляд более правомерным было бы использование термина эффективность.

2. Часть исследований декларируется как изучение механизма действия. Это не совсем точно, поскольку современные представления о механизме действия этиотропного противовирусного препарата включают прямое определение точной мишени его действия на основе рентгеноструктурного анализа (что было сделано для плеконарила), докинга и т.д. Исследования, проведенные в работе, на основании времени добавления соединений к культуре клеток и их термостабильности являются опосредованными и только отчасти позволяют предположить механизм действия, логичнее их обозначить как определение стадии жизненного цикла вируса, на которые действуют соединения.

3. Результаты гистологического исследования иллюстрированы небольшим количеством микрофотографий ткани поджелудочной железы. Было бы

целесообразно привести несколько микрофотографий ткани поджелудочной железы для каждой экспериментальной группы животных в отдельном Приложении.

К представленной работе имеются следующие дискуссионные вопросы.

1. В Ваших экспериментах на модели энтеровирусного панкреатита мышей соединение 32 было эффективно при внутрибрюшинном использовании. Пробовали Вы использовать пероральный путь введения, поскольку именно такой прием был бы наиболее желаем при изучаемой инфекции. Кроме того, при сравнении двух путей приема соединения можно было бы получить первичные данные о фармакологическом профиле выбранного соединения. Если изучали пероральный путь введения, то какой результат был получен?

2. Автором были получены мутанты, резистентные к соединениям 32 и 65, путем пассирования вируса в культуре клеток. Не оценивали ли Вы риск возникновения резистентности у мышей на фоне приема соединений, сравнив наличие мутаций и фенотипическую чувствительность вируса, которым проводили заражение, и вируса, выделенного из поджелудочной железы у животных после курса лечения соединениями.

3. В разделе 3.4 дана характеристика штаммов, резистентных к выбранным соединениям-лидерам группы аналогов плеконарила и группы лейковердазилов. Насколько воспроизводимы полученные результаты экспериментов по выработке резистентности, в частности, обнаруженные мутации в генах вирусных белков?

Важно отметить, что все перечисленное ни в коей мере не снижает значимость и ценность работы, возникшие замечания отражают субъективное мнение оппонента, использование перечисленных терминов является правом автора, дискуссионные вопросы могут служить основой для новых идей и дальнейших исследований.

Заключение

Диссертация Волобуевой Александрины Сергеевны на тему: «Характеристика противовирусной активности новых гетероциклических соединений в отношении вирусов рода *Enterovirus*» соответствует паспорту

научной специальности 1.5.10. Вирусология, является законченной научно-квалификационной работой и по актуальности, научной новизне, практической значимости результатов и объему проведенных исследований отвечает требованиям пп. 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (в ред. Постановлений Правительства РФ от 30.07.2014 N 723, от 21.04.2016 N 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, от 26.09.2022 № 1690, от 26.01.2023 № 101, от 18.03.2023 № 415, от 26.10.2023 № 1786, от 25.01.2024 № 62, от 16.10.2024 N 1382), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Волобуева Александрина Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

Согласна на сбор, обработку, хранение и размещение в сети «Интернет» моих персональных данных (в соответствии с требованиями Приказа Минобрнауки России №1 от 09.01.2020 г. (ред. от 01.03.2024 г.), необходимых для работы диссертационного совета 24.1.255.01.

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией экспериментальной вирусологии
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток
им. И.И. Мечникова» Министерства науки и высшего
образования Российской Федерации
доктор биологических наук
e-mail: wnyfd385@yandex.ru, тел: 8-916-211-88-78

Ленёва Ирина Анатольевна

Подпись д.б.н. Ленёвой И.А. заверяю.

Ученый секретарь ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Минобрнауки.

Анна Викторовна Васильева

«21» августа 2025 г.