

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Архипової Марини Андріївни

на тему «Вивчення молекулярних механізмів протівірусної активності флавоноїдів», представлену на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія

### **Актуальність теми дисертації.**

Створення нових лікарських засобів обумовлено виникненням штамів інфекційних агентів стійких до існуючих клінічних препаратів та появою патологічних станів, викликаних невідомими досі інфекційними агентами.

За останні 20 років світ став свідком виникнення інфекційних хвороб (SARS – атипічна пневмонія в 2002 р, пташиний грип  $H_5N_1$  в 2003 р, свинячий грип А ( $H_1N_1$ ) в 2009 р., гарячка Ебола в 2014 р, SARS-CoV-2 – пандемія COVID-19), які мають високу контагіозність та летальність, а відомі антивірусні препарати мають дуже вузький спектр антивірусної дії і в більшості випадків не захищають організм навіть в межах одного виду вірусів. Тому створення лікарських засобів з широким спектром антивірусної дії питання для сучасної фармакології та вірусології є надзвичайно актуальним. В 20 – 21 сторіччі ми стали свідками переходу, а можливо й заміни парадигми відносно філософії «одна інфекція, одна мішень, одні ліки», тобто створення монотаргентних з'єднань, до концепції поліфармакології, автором якої є Andrew L. Hopkins. Використання принципів поліфармакології – ми вважаємо можливим рішенням пошуку структур лігандів, які можуть бути використані, як фундамент, для дизайну антивірусних ліків.

Розробка інноваційного препарату в сучасній фарміндустрії – процес довготривалий та високозатратний. Шлях його створення складається з цілого ряду етапів: вибору біологічної мішені та базової структури її дизайну і докінгу у віртуальну мішень, синтезу структурних рядів похідних базової молекули та біологічних досліджень різного рівня.

В дисертації М.А. Архипової використані принципи поліфармакології, яким відповідають антивірусні препарати рослинного походження.

Багатство та унікальність хімічного складу яких визначає різноманітність фармакологічних властивостей. У галенові препарати включають від 3-5 до 10-15 рослин, обґрунтовано підібрана рецептура у комплексі із щадним режимом переробки рослинної сировини і отримання препарату визначає раціональну спрямованість лікувальної дії при достатній безпеці (наприклад, комбінація протизапальної, антивірусної, імуномодуючої, естрогенної дії). Досягнення подібного поєднання цілей за допомогою синтетичних препаратів або зовсім нереально, або супроводжується побічними реакціями і ускладненнями.

Тому дослідження молекулярних механізмів протівірусної активності флавоноїдів, як препаратів мультитаргетної хіміотерапії вірусних інфекцій є надзвичайно актуальними.

### **Оцінка обґрунтованості наукових результатів дисертації, їх достовірності та новизни.**

Наукова новизна результатів дослідження М.А. Архипової полягає в тому, що вперше експериментально доказано, що флавоноїдвмісна фітокомпозиція на основі лікарських рослин: коренів лабазнику шестипелюсткового (*Filipendula vulgaris*), коренів петрушки кучерявої свіжих (*Petroselinum crispum*), коренів селери свіжих (*Apium graveolens*), трави підмареннику справжнього (*Galium verum*), трави льонку звичайного (*Linaria vulgaris*), квіток нагідок (*Calendula officinalis*), володіє антивірусною активністю по відношенню до вірусів простого герпесу I та II типу, коронавірусу трансмісивного гастроентериту (ТГС) свиней, вірусу папіломи 18 типу людини, сурогатного вірусу гепатиту С – вірусу бичачої вірусної діареї.

Визначені механізми та мішені їх антивірусної дії, які відбуваються на рівні адсорбції цих вірусів завдяки рецептору епідермального фактору росту, інгібіції експресії генів вірусів герпесу та коронавірусу ТГС, індукції інтерферону, апоптозмодуючої активності та впливу на експресію ядерного фактору транскрипції (Nrf-2).

Отже, в дисертаційній роботі поставлене наукове завдання – виявити та вивчити спектр протівірусної дії флавоноїдвмісної фітокомпозиції, а також дослідити молекулярні механізми протівірусної активності – виконано повністю, здобувач повною мірою оволодів методологією наукової діяльності.

### **Оцінка змісту дисертації, її завершеність та дотримання принципів академічної доброчесності.**

За своїм змістом дисертаційна робота здобувача Архипової Марини Андріївни повністю відповідає Стандарту вищої освіти зі спеціальності 091 – Біологія та напрямкам досліджень відповідно до освітньої програми «Прикладна біологія».

Дисертаційна робота є завершеною науковою працею і свідчить про наявність особистого внеску здобувача у науковий напрям «Біологія».

Розглянувши звіт подібності за результатами перевірки дисертаційної роботи на текстові співпадиння, можна зробити висновок, що дисертаційна робота Архипової Марини Андріївни є результатом самостійних досліджень здобувача і не містить елементів фальсифікації, компіляції, фабрикації, плагіату та запозичень. Використані ідеї, результати і тексти інших авторів мають належні посилання на відповідне джерело.

## **Мова та стиль викладення результатів**

Дисертаційна робота написана українською мовою. Дисертація викладена в науковому стилі, насичена цифровим і ілюстративним матеріалом та посиланнями на найновішу літературу по дисертації.

Усі представлені експериментальні результати дисертації, її наукові положення і висновки базуються на власних дослідженнях Архипової М.А. Їх достовірність обумовлена використанням сучасних методів дослідження для вирішення поставлених завдань.

Рецензуєма дисертація викладена на 174 стор. комп'ютерного тексту, складається з 5 розділів: вступ, огляд літератури, матеріали і методи, 2-х розділів власних досліджень, обговорення одержаних результатів, висновків та переліку використаної літератури, який складається із 172 джерел вітчизняних та зарубіжних авторів, 40% цитованих робіт 2020-2024 рр. Робота ілюстрована 45 рисунками і 27 таблицями.

Вступ написаний у відповідності з рекомендаціями ВАК України, представлений на 7 сторінках. Автор розкриває суть проблеми шляхом критичного аналізу, висвітлює актуальність, її зв'язок з плановою науково-дослідною роботою Київського політехнічного інституту ім. Ігоря Сікорського, кафедра трансляційної медичної біоінженерії, в рамках НДР «Розробка інноваційних біомедичних технологій та продуктів для діагностики та лікування патологій людини» під керівництвом декана факультету біомедичної інженерії КПІ ім. Ігоря Сікорського, д.б.н., проф. Галкіна Олександра Юрійовича та в лабораторії експериментальної хіміотерапії вірусних інфекцій ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського» НАМН України в рамках НДР «Клініко-епідеміологічна характеристика, лікування і профілактика COVID-19», «Експериментальне дослідження ефективності та безпечності застосування нових фітохімічних та бактерійних препаратів для лікування коронавірусної та інших найпоширеніших інфекцій», «Визначення ролі рецепторів епідермального фактору росту при деяких вірусних інфекціях (COVID-19, гепатит С, герпетична інфекція)» під керівництвом зав. ЛЕХВІ ДУ «ІЕІХ ім. Л.В. Громашевського», д.м.н., проф. Рибалко Світлани Леонтіївни.

Визначені мета і завдання роботи, об'єкт, предмет і методи дослідження, наукова новизна і практичне значення роботи.

Огляд літератури складається з одного розділу і трьох підрозділів.

В першому підрозділі представлені результати аналізу сучасної літератури стосовно флавоноїдів та їх ролі в противірусному захисті. В цьому розділі систематизовані всі дослідження, які характеризують хімічну структуру флавоноїдів їх класифікацію та багаточислені приклади біологічної активності.

В даний час відомо 40 видів різноманітних фармакологічних ефектів, що притаманні флавоноїдам, серед яких і антивірусна активність.

Другий підрозділ присвячений біологічно активним флавоноїдним інгредієнтам (АФІ) та їх механізмам антивірусної дії. Останній підрозділ особливо цікавий тому, що написаний за результатами досліджень останніх 2-3 років коли вже з'ясувались нові молекулярні мішені антивірусної дії флавоноїдів в процесі репродукції вірусів: рецептори епідермального фактору росту, ядерний фактор транскрипції та апоптозінфікованих клітин, які відповідають за проникнення вірусу в клітину, вроджений імунітет, запалення та елімінацію програмовано загиблих інфікованих вірусом клітин.

Загалом огляд літератури інформативно та критично узагальнює стан проблеми: свідчить про високу теоретичну підготовку дисертанта.

Власні дослідження починаються розділом «Матеріали і методи», в якому описані використані культури клітин, віруси, специфічні сироватки та тест-системи, досліджувані речовини та референтні препарати, методи класичної вірусології – культивування клітин, визначення цитотоксичності речовин МТТ-методом, методи антивірусного скринінгу з використанням експериментальних моделей вірусних інфекцій. Молекулярно-біологічні методи аналізу – полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), виявлення апоптотичних клітин, тестування ІФНа. Метод ідентифікації можливих мішеней досліджуваних сполук на основі фармакофорного методу (PharmMapper) *in silico*.

Слід підкреслити, що дисертація М.А. Архипової є фрагментом наукового напрямку, яке розробляється на кафедрі трансмісійної медичної біоінженерії та в лабораторії хіміотерапії вірусних інфекцій з початку їх створення серії пріоритетних наукових досліджень молекулярних механізмів репродукції, вірусів грипу, герпесу, коронавірусів, методів діагностики і хіміотерапії цих інфекцій. Результати дослідження М.А. Архипової – один з важливих фрагментів цієї проблеми, яка об'єднує розробку методичних підходів, зокрема, вперше в антивірусний скринінг вірусних інфекцій введено прогнозування антивірусної активності і молекулярних мішеней за допомогою комп'ютерних програм, розробка методів тестування експресії рецепторів епідермального фактору росту та ядерного фактору транскрипції (NRF2), методу молекулярно-генетичної (індикації коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней).

Результати експериментальних досліджень представлені в розділах 3, 4.

Розділ 3 «Дослідження антивірусної активності фітопрепарату та його активних флавоноїдних компонентів», в якому представлені результати визначення антивірусної активності різних форм фітопрепарату (спиртовий розчин, екстракт та капсульна маса) на моделях вірусів герпесу I та II типу, коронавірусу ТГС, сурогатного вірусу гепатиту С – вірусу бичачої вірусної діареї та папіломавірусу 18 типу. За допомогою антивірусного скринінгу автором

визначені параметри цитотоксичності різних форм фітопрепарату та синтетичних флавоноїдів на чутливих культурах клітин до досліджуваних вірусів. В результаті проведених досліджень було показано, що цитотоксичність фітопрепарату була значно меншою у порівнянні з синтетичними препаратами.

У наступних підрозділах визначені ефективні концентрації фітопрепарату та синтетичних флавоноїдів по відношенню до вірусів герпесу I та II типів, вірусу гепатиту С – сурогатний вірус бичачої вірусної діареї, коронавірусу ТГС та папіломавірусу 18 типу та підраховані їх індекси селективності. Згідно отриманих результатів найбільш ефективними антивірусними формами фітопрепарату були екстракт препарату та капсульна маса. Розроблена ефективна схема комбінованого лікування фітопрепаратом *per os* та нанесенням аплікацій на ранову поверхню статевого герпесу.

За індексом селективності синтетичні препарати флавоноїдів виявили різну ступень активності до різних моделей вірусів: найбільш активними до вірусів герпесу I типу були лютеолін, рутин, ізорамнетин; до коронавірусу ТГС – апігенін, лютеолін.

Четвертий розділ: Механізм противірусної дії фітопрепарату та його активних флавоноїдних компонентів, в якому представлені результати дослідження впливу фітопрепарату на синтез РНК та ДНК, інтерфероніндукуючу активність, вплив на апоптоз інфікованих вірусами клітин, генну структуру вірусів герпесу I типу та коронавірусу ТГС, молекулярний докінг фітопрепарату в сайти зв'язування РНК-полімерази, протеази та метилтрансферази вірусу SARS-CoV-2 та сайт зв'язування гелікази папіломавірусу людини, а також вплив на експресію гену ядерного фактору трансфекції NRF2.

Вперше М.А. Архиповою були отримані результати, які показали мультитаргентний механізм антивірусної дії фітопрепарату: блокування синтезу РНК в системі транскрипції РНКП Т7 та синтезу ДНК, препарат індукує  $\alpha$ -інтерферон, знижує вміст апоптотичних клітин більш ніж на 15%, специфічно інгібує ген UL-10, який кодує глікопротеїн М вірусу герпесу I типу, гени ORF1 та ORF3 в вірусу трансмісивного гастроентериту свиней.

Методом молекулярного докінгу активних флавоноїдних компонентів фітопрепарату в ферментні мішені РНК-залежної РНК-полімерази, протеази та метилтрансферази SARS-CoV-2 було показано, що відбувається блокування каталітичного центру, що дозволило автору висунути гіпотезу у відповідності з якою присутність всіх біологічно активних сполук у фітопрепараті забезпечує значну антивірусну дію досліджуваного фітопрепарату. Методом молекулярного докінгу доказано, що димер-геліказних білків ВПЛ E1-E2 може бути мішенню для фітопрепарату.

Пріоритетними є дослідження впливу фітопрепарату на експресію рецепторів епідермального фактору росту та ядерного фактору транскрипції.

Вважаю цей розділ дисертації важливим як в теоретичному так і практичному плані.

Аналіз та узагальнення результатів написаний професійно, що є ще одним свідченням здатності автора до глибокого аналізу одержаних результатів і можливості зробити висновки з власних досліджень та даних літератури.

Зроблено чотири висновки, які відповідають виявленим результатам дослідження.

Повнота викладення наукових результатів представлена в основних публікаціях.

Дисертаційна робота оформлена відповідно до вимог наказу МОН України від 12 січня 2017 р. № 40 «Про затвердження вимог до оформлення дисертації».

### **Оприлюднення результатів дисертаційної роботи**

Наукові результати дисертації висвітлені у 21 науковій публікації здобувача, серед яких: 4 статті у наукових виданнях, включених на дату опублікування до переліку наукових фахових видань України; 3 статті у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та/або Scopus, з яких 1 стаття у виданні, віднесеному до першого — третього квартилів (Q1—Q3) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports.

Також результати дисертації були апробовані на 14 наукових фахових конференціях.

Було проведено біоетичну експертизу дисертаційних досліджень, про що є висновок Комітету з медичної етики та деонтології ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України» № АЕС/25/2021.

Таким чином, наукові результати описані в дисертаційній роботі повністю висвітлені у наукових публікаціях здобувача.

### **Недоліки та зауваження до дисертаційної роботи.**

Робота, яка виконана на високому науково-методичному рівні, на жаль, не позбавлена від деяких недоліків, в тому числі невдалих висловлювань та помилок, більшість з яких вказана на сторінках 101, 113, 142, 143.

В розділі 3.3 невдалі рис. 3.13.

Вважаю не зовсім вдалою та малоінформативною назву Вашого препарату.

Запитання для обговорення:

1. Як Ви вважаєте, наскільки співпадають мішені дії біологічно-активних інгредієнтів визначені Вами методами комп'ютерного моделювання та в біологічних дослідженнях?



2. При вивченні молекулярно-біологічних механізмів антивірусної дії Вашого препарату біологічними методами Ви порівнювали дію Вашого препарату та активних фармакологічних інгредієнтів (АФІ) на різних моделях вірусних інфекцій, як Ви вважаєте, які АФІ більш ефективні, наприклад, при коронавірусній інфекції?

Вважаю, що висловлені зауваження не є визначальними і не зменшують загальну наукову новизну та практичну значимість результатів та не впливають на позитивну оцінку дисертаційної роботи.

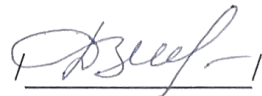
### **Висновок про дисертаційну роботу**

Вважаю, що дисертаційна робота здобувача ступеня доктора філософії Архипової Марини Андріївни на тему «Вивчення молекулярних механізмів противірусної активності флавоноїдів» виконана на високому науковому рівні, не порушує принципів академічної доброчесності та є закінченим науковим дослідженням, сукупність теоретичних та практичних результатів якого розв'язує наукове завдання, що має істотне значення для біології. Дисертаційна робота за актуальністю, практичною цінністю та науковою новизною повністю відповідає вимогам чинного законодавства України, що передбачені в п. 6 – 9 «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44.

Здобувач Архипова Марина Андріївна заслуговує на присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія.

### **Офіційний опонент:**

Зав. кафедри мікробіології, вірусології  
та імунології Національного університету  
охорони здоров'я України  
ім. Платона Шупика МОЗ України,  
д.м.н., проф.



Ірина ДЗЮБЛИК

М.П.

