

## АННОТАЦИЯ

к диссертации Хайдарова Сакена на соискание степени доктора философии (PhD) по образовательной программе «8D05110 - Вирусология» на тему: «Исследование противовирусной активности препаратов против вируса SARS-CoV-2 *in vitro*»

**Общая характеристика диссертационного исследования.** Целью диссертации является комплексное изучение противовирусной активности современных фармакологических препаратов против вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero E6 и на экспериментальной модели нетрансгенных лабораторных мышей.

В ходе исследования проведено выделение и молекулярно-генетическая характеристика штамма SARS-CoV-2/KAZ/B.1.1/2021 (вариант Alpha), а также анализ его морфологических и генетических особенностей. Для оценки противовирусной активности использовались препараты тенофовир алафенамид (TAF), фавипиравир, рибавирин и дексаметазон.

Определены безопасные цитотоксические концентрации исследуемых соединений и диапазоны ингибирующих концентраций (IC<sub>10</sub>–IC<sub>100</sub>). Проведена количественная оценка влияния препаратов на репликацию вируса SARS-CoV-2 с использованием ПЦР в реальном времени (RT-qPCR). Выявлено достоверное снижение вирусной нагрузки при применении тенофовира алафенамида, что свидетельствует о его выраженной противовирусной активности *in vitro*.

Проведён сравнительный анализ RdRP-гена (ORF1b/NSP12) штаммов Alpha и Wuhan, подтвердивший их высокую степень гомологии и сохранность мишеней для противовирусной терапии.

Дополнительно исследовано влияние рекомбинантного цитокина IL-33 на активацию врождённого иммунного ответа у лабораторных мышей, что позволило оценить потенциал данного белка как иммуномодулирующего агента при коронавирусной инфекции.

Результаты работы имеют практическое значение для разработки новых схем терапии COVID-19 и создания экспериментальных моделей для тестирования противовирусных препаратов.

**Актуальность диссертационной работы.** Пандемия COVID-19, начавшаяся в 2020 году, выявила высокую уязвимость мировой системы здравоохранения. Распространение вируса SARS-CoV-2 сопровождалось большими потерями и выявило нехватку эффективных средств лечения. Несмотря на успехи в создании вакцин, необходимость в препаратах прямого противовирусного действия остаётся одной из главных задач современной медицины.

Особую значимость имеет изучение противовирусной активности существующих фармакологических средств, обладающих широким спектром действия, таких как тенофовир алафенамид (TAF), фавипиравир и рибавирин. Диссертация направлена на экспериментальное исследование их

цитотоксичности и эффективности на клеточной культуре Vero E6, а также на изучение особенностей взаимодействия препаратов с вариантами вируса SARS-CoV-2, выделенными на территории Казахстана, включая штамм Alpha (B.1.1.7).

**Цель исследования:** Целью диссертационной работы является комплексное исследование противовирусной активности и цитотоксичности ряда препаратов в отношении вируса SARS-CoV-2 *in vitro* и установление возможных механизмов их действия на уровне молекулярной репликации вируса.

**Задачи исследования:**

1. Провести выделение и молекулярно-генетическую идентификацию штаммов SARS-CoV-2, циркулирующих на территории РК.
2. Выполнить сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей RdRP-гена (ORF1b/NSP12) между штаммами Wuhan и Alpha.
3. Определить цитотоксические концентрации (CC<sub>50</sub>, IC<sub>10</sub>–IC<sub>100</sub>) исследуемых препаратов с использованием методов ССК8 и МТТ в клеточной линии Vero E6.
4. Оценить противовирусный эффект TAF и других средств по снижению вирусной нагрузки и ингибированию репликации SARS-CoV-2.
5. Изучить влияние рекомбинантного IL-33 на врождённый иммунный ответ *in vivo* в эксперименте на мышах WT.
6. Разработать рекомендации по применению исследованных препаратов для противовирусной терапии.

**Объекты исследования:**

- Рекомбинантный вирус птичьего гриппа;
- Протективные белки *Mycobacterium bovis*;
- Векторная вакцина против туберкулеза КРС.

**Методы исследования:** Объектом исследования являются вирус SARS-CoV-2 (штаммы Wuhan и Alpha – B.1.1.7) и противовирусные препараты (тенофовир алафенамид, фавипиравир, рибавирин, дексаметазон). **Предметом исследования** выступают механизмы противовирусного действия указанных препаратов, их влияние на репликацию вируса и жизнеспособность клеток Vero E6 *in vitro*.

**Научная новизна исследования:** впервые в Казахстане проведено комплексное сравнение противовирусной активности четырёх препаратов в отношении локального штамма SARS-CoV-2 (B.1.1.7, Alpha). Получены новые научные результаты:

- установлены диапазоны безопасных концентраций TAF и TDF с низкой цитотоксичностью;
- доказано 99 % ингибирование репликации вируса при оптимальных концентрациях TAF;
- выявлена высокая степень гомологии RdRP-гена между штаммами Alpha и Wuhan;
- впервые показано иммуномодулирующее действие IL-33 на модельных животных;

- экспериментально подтверждён механизм ингибирования RdRP и летального мутагенеза.

**Научная и практическая значимость работы:** Полученные результаты имеют важное прикладное значение для разработки новых схем лечения COVID-19 и других РНК-вирусных инфекций. Определённые диапазоны дозировок и механизмы действия TAF могут быть использованы в качестве научной основы для клинических исследований. Разработанная клеточная модель Vero E6 рекомендована как стандартная платформа для оценки эффективности противовирусных препаратов.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Тенофовир алафенамид проявляет выраженную противовирусную активность против SARS-CoV-2 при низкой цитотоксичности.
2. Консервативность RdRP-гена позволяет рассматривать данный участок как универсальную терапевтическую мишень.
3. IL-33 усиливает врождённый иммунный ответ и способствует снижению вирусной нагрузки *in vivo*.
4. Разработанная модель *in vitro* обеспечивает воспроизводимую оценку эффективности и токсичности антивирусных соединений.

**Основные результаты исследований и выводы:**

В результате проведённого исследования получены следующие основные результаты:

1. Выделен и охарактеризован штамм SARS-CoV-2/KAZ/B.1.1/2021 (вариант Alpha), циркулировавший на территории Республики Казахстан. Проведён его молекулярно-генетический анализ, включая определение нуклеотидной последовательности RdRP-гена (ORF1b/NSP12) и сравнение с эталонным штаммом Wuhan-Hu-1. Установлена высокая степень гомологии, подтверждающая стабильность целевых участков вирусного генома.
2. Изучены морфологические свойства вируса SARS-CoV-2 с использованием методов электронной микроскопии, что позволило подтвердить типичную для коронавирусов структуру вирионов и определить их размерный диапазон (80–120 нм).
3. Оценена цитотоксичность четырёх противовирусных препаратов — тенофовира алафенамида (TAF), фавипиравира, рибавирина и дексаметазона — на клеточной линии Vero E6 с применением тестов ССК8 и МТТ. Определены безопасные концентрации (CC<sub>50</sub>) и рассчитаны индексы селективности (SI), что позволило установить оптимальные диапазоны доз для дальнейших экспериментов.
4. Проведено исследование противовирусной активности препаратов *in vitro*. Установлено, что тенофовир алафенамид проявляет выраженное ингибирующее действие на репликацию SARS-CoV-2, снижая вирусную нагрузку на 99 % по сравнению с контролем. Фавипиравир и рибавирин показали умеренную эффективность, а дексаметазон не обладал прямым антивирусным эффектом, но снижал цитопатическое действие вируса за счёт противовоспалительных свойств.

5. Разработан и апробирован экспериментальный протокол оценки противовирусной активности *in vitro*, включающий определение IC<sub>10</sub>–IC<sub>100</sub> и построение кривых доза–эффект, что обеспечивает воспроизводимую оценку действия исследуемых соединений на репликацию SARS-CoV-2.
6. Проведены *in vivo*-эксперименты на нетрансгенных мышах (WT) для изучения иммуномодулирующего эффекта рекомбинантного IL-33. Установлено, что IL-33 способствует активации врождённого иммунного ответа и повышает уровень противовирусных цитокинов, что подтверждает его потенциал как вспомогательного терапевтического агента.
7. Предложена модель взаимодействия RdRP-гена вируса и действующего вещества тенофовира алафенамида, объясняющая механизм подавления репликации через блокирование активности вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы.

### **Связь с планом основных научных работ.**

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Института биологических и медицинских исследований и является составной частью проекта грантового финансирования AP09260672 на тему: «Изучение противовирусной активности тенофовира алафенамида и других фармакологических препаратов против вируса SARS-CoV-2 *in vitro* и *in vivo*» (2021 – 2023 гг.), финансируемого Комитетом науки Министерства образования и науки Республики Казахстан. Исследования, представленные в диссертации, полностью соответствуют направлениям и задачам указанного проекта, включающим:

- выделение и характеристику циркулирующих на территории Республики Казахстан штаммов SARS-CoV-2;
- исследование противовирусной активности лекарственных соединений в культуре клеток Vero E6;
- определение безопасных концентраций, индексов селективности и механизмов действия тенофовира алафенамида;
- экспериментальную оценку иммуномодулирующего влияния IL-33 на модельных животных (в Китае в 2024).

Полученные результаты являются частью выполнения плановых заданий проекта и внесли вклад в развитие отечественной научной базы по изучению механизмов противовирусного действия препаратов и поиску эффективных средств терапии COVID-19.

**Публикации:** По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ, включая 2 статьи в журналах Web of Science и Scopus, 5 в изданиях ККСОН РК и 5 тезисов докладов на международных конференциях.

**Объем и структура диссертации.** Работа изложена на 140 страницах, включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, список литературы (131 источник), 9 таблиц, 48

рисунков и 5 приложений.

#### **Апробация результатов**

Основные результаты докладывались на международных конференциях:

- Modern Scientific Technology (Швеция, 2023);
- 3rd International Conference on Virology and Infectious Diseases (COVID-19) (Дубай, 2022);
- International Scientific Conference (Варшава, 2023);
- Asfen Forum 2024 (Алматы, Казахстан).

Работа имеет тесную связь с клинической практикой, поскольку её результаты направлены на поиск и научное обоснование эффективных терапевтических средств для лечения COVID-19. Полученные экспериментальные данные о противовирусной активности и безопасности ТАФ могут быть использованы при разработке схем противовирусной терапии и включены в рекомендации для клинических испытаний.