

ОТЗЫВ

**официального оппонента, доктора медицинских наук
Бурцевой Елены Ивановны на диссертационную работу Аль Фарруха
Мохаммада «Влияние снижения показателей статуса меди на течение
гриппозной инфекции у мышей», представленную на соискание ученой
степени кандидата биологических наук
по специальностям: «1.5.10 – Вирусология» и «1.5.4 – Биохимия»**

Грипп остается одной из проблем здравоохранения, ежегодно вызывая эпидемические подъемы заболеваемости, сопровождающиеся ростом показателей госпитализации и смертности, и оказывая существенное влияние на экономику каждой страны мира. Несмотря на наличие широкого спектра отечественных противогриппозных вакцин и противовирусных препаратов, высокая изменчивость вируса гриппа нередко приводит к снижению эффективности их применения, одним из ярких примеров послужил последний пандемический вариант вируса гриппа А - А(Н1N1)pdm09 в 2009г. В связи с этим актуальными являются подходы, направленные не на прямое подавление вирусной репликации, а на модуляцию метаболических процессов организма хозяина, которые могут предупредить развитие тяжелых форм инфекции и развитие последующих осложнений.

В частности, активные формы кислорода (АФК) играют ключевую роль в регуляции многих физиологических процессов, включая иммунный ответ организма. Повышенные уровни АФК способствуют активации воспалительных реакций и окислительного стресса, что может негативно сказаться на состоянии клеток и тканей. При инфицировании клеток вирусом гриппа А запускается ряд сигнальных путей, приводящих к увеличению продукции АФК. Эти молекулы участвуют в процессе уничтожения вирусов внутри клетки путем повреждения вирусных белков и нуклеиновых кислот.

Однако чрезмерное накопление АФК также повреждает собственные структуры клетки, вызывая апоптоз и некроз, что способствует распространению вируса. Использование ингибиторов АФК в сочетании с традиционными противовирусными препаратами может повысить эффективность лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа А. Это направление активно исследуется в настоящее время, поскольку открывает новые возможности для разработки эффективных методов профилактики и лечения инфекционных заболеваний. Снижение уровня АФК является перспективным направлением в борьбе с вирусом гриппа А, способствуя улучшению состояния пациентов и повышению эффективности терапевтических мероприятий. В свою очередь ионы меди входят в состав ферментов ($\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{1+}$), которые отвечают за защиту организма от свободных радикалов.

Работа Аль Фарруха Мохаммада посвящена изучению одного из таких подходов, а именно – оценке влияние снижения показателей статуса меди на течение гриппозной инфекции у мышей и определению механизмов, лежащих в основе наблюдаемых изменений, что является актуальным направлением и в последующем может иметь практическое применение. Работа является логическим продолжением серии работ профессора Пучковой Л.В. по изучению белковых транспортёров (CTR1, DMT1) ионов металлов и металлопротеинов (ЦП, СОД1), в частности, ионов меди.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Работа выполнена на современном научно-методическом уровне. Отдельно необходимо подчеркнуть, что диссертант применил широкий спектр современных методов вирусологии, молекулярной биологии, биохимии, биофизики и биоинформатики, что подтверждает полноту и глубину анализа

полученных результатов. Выводы, сделанные диссертантом, соответствуют поставленной цели и задачам, а практические рекомендации логично вытекают из результатов выполненной диссертационной работы. Положения, выносимые на защиту, аргументированы, подтверждены экспериментальными данными, соответствуют содержанию работы.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов.

Рабочая гипотеза и экспериментальный подход составляют научную новизну работы. Достоверность результатов, сформулированных положений и выводов подтверждена объемом выполненных исследований, а также корректной статистической обработкой полученных результатов, полнотой литературно-библиографической справки, глубоким и аргументированным анализом полученных результатов.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Результаты, полученные Аль Фаррухом Мохаммадом, выявляют новые данные о связях метаболических процессов восприимчивого организма хозяина и стратегии генома вируса гриппа А. В частности, автор показал, что репродукция вируса гриппа предусматривает модификацию гомеодинамики меди в легких за счет повышения уровня экспрессии гена прионового белка и смещения сплайсинга первичного продукта транскрипции гена белка церулоплазмينا (ЦП) в сторону формирования ЦП-мРНК, приводящей к повышению вирус-опосредованной концентрации эндоцитированной меди в легких.

Автор показал причинно-следственную связь между показателями статуса меди (ПСМ) и снижением летальности от вирусной инфекции, суть которой заключается в предотвращении цитокинового шторма, обусловленного гибелью нейтрофилов в отсутствии холо-ЦП.

Получены новые характеристики по иммуногенным свойствам пандемического штамма вируса гриппа A/South Africa/3626/2013 (H1N1)pdm09, что позволит в будущем его применение в качестве модельного вируса при изучении новых вакцин и препаратов против гриппа.

Соответствие диссертации паспортам специальности

По тематике, методам исследования, основным положениям и выводам диссертация соответствует паспортам научных специальностей 1.5.10-вирусология и 1.5.4 - биохимия.

Полнота освещения результатов диссертации в печати

По теме диссертационной работы опубликовано 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ, или входящих в международные системы цитирования и реферативные базы данных, из них 5 – первого квартиля по JCR (Web of Science). Основные материалы по обеим специальностям были полностью представлены в опубликованных работах. Результаты исследования были обнародованы на 13 научных профильных форумах разного уровня, от конференций молодых ученых до международных симпозиумов.

Содержание и оформление диссертационной работы.

Работа изложена на 142 страницах машинописного текста, включает 43 рисунка и 5 таблиц, что свидетельствует о высокой степени визуализации и подтверждения экспериментальных данных. Библиография содержит 250 источников, среди которых значительную часть составляют зарубежные публикации последних лет, что отражает современность и глубину теоретической базы исследования. Диссертация включает разделы «Общая характеристика работы», «Обзор литературы», «Материалы и методы»,

«Результаты и их обсуждение», «Заключение», а также приложения, где, в частности, приведен перечень 134 штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09, использованных для проверки уникальности мутаций модельного штамма A/South Africa/3626/2013 (H1N1)pdm09, и дополнительные иллюстративные материалы.

В разделе «Общая характеристика работы» автор обосновывает актуальность темы, формулирует цель и задачи исследования, определяет научную новизну, теоретическую и практическую значимость, а также уточняет личный вклад.

Раздел «Обзор литературы» систематизирует современные представления о гомеостазе меди, метаболических эффектах вирусной репликации и попытках фармакологического вмешательства в эти процессы.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны методологические подходы: синтез и характеристика наночастиц серебра, выбор и анализ штаммов вируса, методы определения экспрессии генов и активности ферментов, а также примененные статистические методы.

Глава «Результаты и их обсуждение» раскрывает как научную логику эксперимента, так и полученные данные.

Для достоверной оценки влияния снижения ПСМ (показателя статуса меди), вызванное введением наночастицами серебра (AgNPs), на патогенез гриппозной инфекции у мышей, прежде всего потребовалось выбрать модельный вирус, обладающий высокой патогенностью для мышей и, вместе с тем, антигенно близкий к современным циркулирующим штаммам вируса, вызвавшего пандемию в 2009г. В связи с этим первая часть исследования была посвящена поиску и характеристике подходящего модельного штамма. Автор сконцентрировал свое внимание на вирусах, подобных вирусам A(H1N1)pdm09. Аль Фаррух Мохаммад сделал сравнительный анализ двадцати одного штамма вируса гриппа A(H1N1)pdm09, выделенных в 2009–

2020 гг., включая оценку температурочувствительности (*ts/non-ts* фенотип), термостабильности гемагглютинаина, токсичности и патогенности для мышей, а также определение летальной дозы (LD_{50}). Единственным штаммом, сочетающим *non-ts* фенотип (сохранение репликации при температуре 40°C), высокую термостабильность НА, высокую токсичность и патогенность для мышей, оказался штамм A/South Africa/3626/2013 (SA), для которого LD_{50} составила $4.8 \log_{10}$ ЭИД₅₀/мл. Генетический анализ выявил у него три уникальные замены в субъединицах полимеразного комплекса PB1 и PB2 (Q687R, N102T, E358E/K), отсутствующие у других протестированных 20-ти штаммов и дополнительно 134-х проанализированных штаммов, представленных в базе GISAID. Эти аминокислотные замены локализованы в областях, участвующих в стабилизации межсубъединичных взаимодействий полимеразы и могут повышать эффективность репликации вирусного генома. Сравнение штамма SA с классическим адаптированным модельным вирусом A/PR8 показало, что он обладает сопоставимой патогенностью и репликативной активностью, при этом антигенно соответствует современным циркулирующим вирусам. Таким образом, штамм SA был обоснованно выбран как модельный вирус для всех дальнейших этапов работы.

Вторая часть исследования была направлена на изучение влияния снижения показателей статуса меди, моделируемого инъекциями наночастиц серебра (AgNPs), на течение инфекции, вызванной штаммом SA. Было показано, что наночастица серебра вмешиваются в обмен меди благодаря структурному сходству ионов Ag(I) и Cu(I), снижая образование холо-церулоплазмينا и функциональную доступность меди. Ключевым результатом исследования явилось установление того, что снижение статуса меди приводит к существенному увеличению выживаемости мышей, инфицированных вирусом SA. В то время как в контрольной группе летальность составила 100%, в группе животных, получавших наночастица

серебра, выживаемость достигала 30%. Защитный эффект носил дозозависимый характер. Важно, что при этом вирусная нагрузка в легких не изменялась, что исключает прямое противовирусное действие наночастиц и указывает на опосредованный иммунно-метаболический механизм. Проведенное соискателем исследование демонстрирует, что модуляция метаболизма меди способна ослаблять тяжесть гриппозной инфекции за счет противодействия влиянию вируса на систему антиоксидантной защиты и регуляции воспалительного ответа, а не за счет подавления репликации вируса.

Представленный набор данных позволяет сделать общие выводы о том, что неадаптированный к мышам вирус гриппа A/South Africa/3626/2013 (H1N1)pdm09 может быть с успехом использован для оценки потенциальных противовирусных и антитоксических препаратов и вакцин-кандидатов, а регуляция метаболизма меди является перспективным направлением контроля гриппозной инфекции, так как снижение доступности меди позволяет ограничить патологическую активацию воспалительных механизмов и предотвратить критические повреждения тканей при сохраненной вирусной нагрузке. Это позволяет рассматривать наночастицы серебра в качестве перспективных агентов непрямого противовирусного действия.

Структура диссертации оформлена в строгом соответствии с требованиями ВАК и характеризуется логичностью и завершенностью. Рукопись диссертации четко систематизирована, последовательность экспериментов грамотно выстроена от описания явления к расшифровке его тонких механизмов.

Замечания по оформлению. Стандартные отклонения, приведенные на некоторых столбчатых диаграммах, делают значения $\pm$ SD перекрывающимися или превосходящими среднее значение. Так на рис. №32 Г (только AgNPs) и Д (после заражения) стандартные отклонения значений

содержания серебра перекрываются в печени и сыворотке крови. Однако автор, сравнивая концентрации соглашается с недостоверностью этих данных: «При этом содержание серебра в сыворотке крови и печени у зараженных вирусом мышей не меняется достоверно (Рис. 32 Г и Д)». Имеются некоторые опечатки в тексте и отсутствие склонения слов особенно в главе «Обзор литературы». Видимо, это сложности перевода и адаптации текста с англоязычных статей на русский. Например: «аминовая группа» вместо аминокгруппа, или «Введение ионное серебро лабораторным грызунам...», стр.54. В автореферате список публикаций по теме диссертации и тезисов конференций следовало выстроить по временной нарастающей – от старых работ к новым. Сделанные замечания не снижают научной и практической ценности диссертационной работы и не влияют на общую положительную оценку полученных результатов.

Автореферат диссертации оформлен в соответствии с установленными требованиями и полностью соответствует основным положениям диссертации.

Таким образом, диссертационная работа Аль Фарруха Мохаммада представляет собой отличный пример эффективности междисциплинарного взаимодействия, когда, благодаря опыту диссертанта в разных областях науки, создаются инновационные разработки, невозможные при выполнении исследований по одному из направлений.

После прочтения диссертации и автореферата возникло несколько вопросов дискуссионного плана:

1. С одной стороны, идея разработки противогриппозного препарата широкого спектра, эффективность которого не зависит от антигенной изменчивости вируса гриппа, очень заманчива. Но, с другой стороны, речь идет об опосредованном влиянии на организм хозяина. Не боитесь ли Вы, что, убив вирус, Вы одновременно нанесете серьезный ущерб (вплоть до фатального исхода) организму заболевшего человека, вмешавшись в его метаболизм?

2. В арсенале вирусологов уже имеется ряд известных и широко изученных модельных вирусов гриппа, адаптированных к мышам и вызывающих у них тяжелые пневмонии с летальным исходом. Это вирусы гриппа человека всех основных серотипов/типов – такие, как А/PR8 (H1N1), А/Виктория/35/72 (H3N2), А/Аичи/2/68 (H3N2), В/Lee/40. С какой целью Вам понадобился еще один патогенный для мышей вирус, была ли в этом необходимость и в чем тут заключается новизна?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Аль Фарруха Мохаммада на тему «Влияние снижения показателей статуса меди на течение гриппозной инфекции у мышей», по актуальности, методическому исполнению, объему выполненных исследований, научной новизне и практической значимости полностью соответствует требованиям ВАК, поскольку является завершённой научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи по изучению влияния низких уровней ионов меди в купроэнзимах на течение гриппозной инфекции у лабораторных мышей, как нового подхода в вопросах патогенетического лечения и профилактики, и полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. (с изменениями в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г., № 1168 от 01.10.2018 г., № 426 от 20.03.2021 г., № 1539 от 11.09.2021 г., № 1690 от 26.09.2022 г., № 101 от 26.01.2023 г., № 1786 от 26.10.2023 г., № 62 от 25.01.2024 г., № 1382 от 16.10.2024 г., с изменениями и дополнениями, вступившими в силу с 01.01.2025 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а его автор, Аль

Фаррух Мохаммад, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: «1.5.10 – Вирусология» и «1.5.4 – Биохимия».

Официальный оппонент:

Бурцева Елена Ивановна,

д.м.н., 1.5.10 - вирусология, 3.2.2 – эпидемиология

(по диплому - 03.00.06 - вирусология, 14.00.30 – эпидемиология),

заведующая лабораторией этиологии и эпидемиологии гриппа

ФГБУ «Национальный исследовательский

Центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного

академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

Москва 123098, ул. Гамалеи д.18

e-mail: elena-burtseva@yandex.ru

тел.8 499 190 3046

Подпись Бурцевой Е.И. заверяю.

Ученый секретарь

«11» ноября 2025 года

