

**АЛЬ ФАРРУХ МОХАММАД**

**ВЛИЯНИЕ СНИЖЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СТАТУСА МЕДИ НА  
ТЕЧЕНИЕ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У МЫШЕЙ**

**1.5.10 – Вирусология**

**1.5.4 – Биохимия**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Санкт-Петербург**

**2025**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ») и Санкт-Петербургском государственном университете (СПбГУ).

Научные руководители: **Киселева Ирина Васильевна**  
доктор биологических наук, профессор,  
руководитель лаборатории общей вирусологии  
отдела вирусологии и иммунологии им. А.А.  
Сморodinцева ФГБНУ «ИЭМ», профессор  
кафедры фундаментальных проблем медицины и  
медицинских технологий Медицинского  
института СПбГУ

**Пучкова Людмила Валентиновна**  
доктор биологических наук, профессор, ведущий  
научный сотрудник отдела молекулярной  
биологии, генетики и фундаментальной медицины  
ФГБНУ «ИЭМ»

Официальные оппоненты: **Тиньков Алексей Алексеевич**  
доктор медицинских наук, главный научный  
сотрудник института биоэлементологии ФГБОУ  
ВО «Оренбургский государственный университет»

**Зарубаев Владимир Викторович**  
доктор биологических наук, заведующий  
лабораторией экспериментальной вирусологии  
ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии  
имени Пастера» Роспотребнадзора

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное  
учреждение «Национальный медицинский  
исследовательский центр имени В. А. Алмазова»  
Министерства здравоохранения Российской  
Федерации

Защита диссертации состоится 2 декабря 2025 г. в 11 часов 00 минут на заседании Диссертационного совета Д 21.1.017.01, созданного на базе ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Сморodinцева» Минздрава РФ по адресу: 197376, РФ, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 15/17, тел. (812) 499 15 00, e-mail: office@influenza.spb.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Сморodinцева» Минздрава РФ и на сайте <https://www.influenza.spb.ru/>

Автореферат диссертации разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 года

Ученый Секретарь  
диссертационного совета Д 21.1.017.01:  
Кандидат биологических наук

Амосова И. В.

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Вирус гриппа (ВГ) ежегодно поражает до 5–15% населения земного шара. Серьезную угрозу представляют эпидемии и пандемии гриппа, которые происходят 3–4 раза в столетие и характеризуются очень быстрым распространением, процентом заболеваемости, намного превышающим норму, и высокой смертностью во всех группах населения. Они ложатся тяжелым бременем на систему здравоохранения, создают социально-экономические и военно-оборонные проблемы. Несмотря на многолетние объединенные международные усилия, пока не удалось выработать эффективные средства борьбы даже с сезонными всплесками заболеваний гриппом. Поэтому исследования, посвященные поиску снижения потерь от гриппозной инфекции являются *актуальными*. В настоящее время основными подходами для профилактики и лечения гриппа являются вакцинация и химиотерапия. Однако высокая изменчивость генома ВГ и периодическое попадание в человеческую популяцию новых, ранее не циркулировавших антигенных вариантов ВГ, существенно снижают эффективность вакцин и приводят к развитию резистентности к специфическим химиопрепаратам. В последние десятилетия разрабатывается новый подход к преодолению вирусных инфекций. Он состоит в поиске метаболических звеньев в клетках-хозяина, воздействия на которые избирательно могли бы подавить вирусную инфекцию. Такие метаболические звенья должны отвечать двум требованиям: они должны быть критичными для репродукции вируса и/или подавлять развитие инфекционного процесса и не должны быть критичными для здоровья хозяина при вмешательстве в работу этой системы.

В представленной работе в качестве системы хозяина, подвергающейся воздействию, выбрана метаболическая система меди (МСМ). Эта система обеспечивает поддержание гомеостаза меди и относительно хорошо охарактеризована на клеточном, органном и организменном уровнях. К характеристическим особенностям МСМ относятся, с одной стороны, отсутствие систем депонирования абсорбированной меди и, с другой – существование систем, обеспечивающих внутриклеточную рециклизацию ионов меди. Благодаря этому трудно создать экспериментальный дефицит биологически ценной меди. Репродукция вируса гриппа А (ВГА) связана с гомеодинамикой меди. Так, блокирование импорта меди в клетки и/или поступление ее в люмен аппарата Гольджи нарушает созревание ВГ. Слияние эндосомальной мембраны и вирусной оболочки, ведущее к освобождению вирусного генома в цитозоль, требует нарушения окислительно-восстановительного баланса, который достигается вирус-опосредованным снижением содержания  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -СОД1. К тому же на всех этапах течения инфекции, вызванной ВГА, уровень экспрессии церулоплазмينا (ЦП), главного медьсодержащего белка сыворотки крови, входящего в семейство мультимедных голубых оксидаз, в 2–3 раза превышает норму.

Баланс меди в организме характеризуется показателями статуса меди (ПСМ). Основными из них являются концентрация общей меди, содержание иммунореактивного и энзиматически активного ЦП в сыворотке крови. Высоко воспроизводимое, стабильное и легко обратимое снижение ПСМ *in vivo* у животных достигается обработкой наночастицами серебра (AgNPs). Это происходит потому, что в биологической среде AgNPs деградируют с образованием ионов серебра, которые изоэлектронны ионам меди в состоянии окисления  $Cu^{1+}$ . Ионы  $Ag^{1+}$  узнаются метал-связывающими сайтами  $Cu^{1+}$ -транспортных белков и переносятся в люмен аппарата Гольджи, где включаются в ЦП. Молекула Ag-ЦП содержит менее 4 атомов меди и не обладает оксидазной активностью. Снижение ПСМ практически до нуля у мышей достигается уже после четырех ежедневных инъекций субтоксических концентраций AgNPs. Такие мыши (Ag-мыши) были использованы в качестве модели животных с низкими ПСМ для изучения связи метаболизма меди с репродукцией ВГА и течением инфекционного процесса, индуцированного им.

**Степень разработанности проблемы.** Изучение влияния AgNPs на репродукцию ВГА проводится с 2011 г. и осуществляется в основном на культивируемых клетках различных линий. Показано, что AgNPs, независимо от способа их получения, размера, формы и покрытия, дозозависимо подавляют репродукцию ВГ и повышают выживаемость инфицированных клеток. В этих работах основное внимание уделяется физико-химической и цитотоксической характеристике синтезированных наночастиц как потенциальных противовирусных препаратов. В них не исследуется и не обсуждается механизм подавления вирусной инфекции AgNPs. Исключение составляет работа группы Garcia-Verdugo I., в которой на культивируемых клетках легочного эпителия человека показано, что AgNPs подавляют аутофагию и таким образом нарушают митохондриальный опосредованный апоптоз (Villeret et al., 2018). Изучение влияния AgNPs на протекание вирусной инфекции *in vivo* ограничивается двумя исследованиями: работой Xiang и соавт., в которой авторы продемонстрировали, что интраназальные обработки AgNPs подавляют смертность мышей, зараженных ВГ, практически до нуля (Xiang et al., 2013), а также исследование Martín-Faivre и соавт., показавшее, что AgNPs усиливают способность альвеолярных макрофагов стимулировать как миграцию NK-клеток, так и выработку IFN- $\gamma$  (Martín-Faivre et al., 2025). Исследований, направленных на изучение *in vivo* протекания вирусной инфекции на фоне низких ПСМ, в литературе не найдено.

**Целью исследования** является изучение влияния снижения ПСМ, вызванное введением AgNPs, на патогенез гриппозной инфекции у мышей.

**Для её достижения были поставлены следующие задачи:**

1. Отобрать из современных вирусов гриппа А (H1N1)pdm09, неадаптированных к лабораторным мышам, штамм, сопоставимый по свойствам с модельным вирусом гриппа PR8, адаптированным к мышам.
2. Изучить динамику поступления в легкие мышей серебра AgNPs.

3. Оценить характер течения вирусной инфекции у мышей, предварительно получивших AgNPs.
4. Сравнить экспрессию генов метаболизма меди на уровне транскрипции, трансляции и формирования зрелых купроэнзимов в легких интактных мышей, мышей, получивших AgNPs, мышей, зараженных ВГА, а также мышей, зараженных ВГА и получивших AgNPs.
5. Изучить способность Ag-церулоплазмينا индуцировать апоптоз нейтрофилов.

**Научная новизна работы.** Результаты, представленные в работе, получены в рамках проверки сформулированной рабочей гипотезы. Предположение постулирует, что экспериментальное снижение ПСМ может влиять или на репродукцию ВГА, или на течение гриппозной инфекции, так как стратегия генома ВГА включает подавление медь-зависимой антиоксидантной защиты и смещения окислительно-восстановительного потенциала в клетке, а также повышение ПСМ в кровотоке. В работе снижение ПСМ достигалось с помощью обработки мышей AgNPs. Этот экспериментальный подход разработан и охарактеризован нами. Вместе, рабочая гипотеза и экспериментальный подход, составляют научную новизну работы: все результаты, представленные в ней, являются новыми. Для снижения ПСМ использованы нетоксичные концентрации AgNPs. Показано, что летальность мышей, зараженных ВГА и получивших AgNPs, снижалась до 30%, по сравнению со 100% летальностью мышей, не получивших AgNPs. Продемонстрировано, что выживаемость мышей зависит от дозы AgNPs и коррелирует с подавлением образования холо-ЦП в печени. Впервые исследованы *in vivo* особенности метаболизма меди в клетках легочного эпителия у интактных мышей, мышей, зараженных ВГА, и мышей, одновременно с заражением ВГА, получивших AgNPs. Показано, что в легких заражение ВГА вызывает не менее чем 2-кратное повышение активности генов, контролирующих в клетке поступление, распределение и выведение меди (*CTRI*, *ATOX1* и *ATP7A*). Повышается уровень мРНК, программирующей синтез секреторной формы ЦП. Напротив, активность генов медь-зависимой антиоксидантной защиты (*СОД1* и *ССС*) снижается. Концентрация мРНК, кодирующих два белка, связанных с плазматической мембраной через ГФИ-якорь (прионовый белок и сплайс-форма ЦП), увеличивается в 3–3.5 раза. Эти белки являются альтернативными донорами меди для СОД1. Обработка мышей AgNPs снижает концентрацию всех мРНК, индуцированных заражением ВГА, и повышает уровень СОД1-мРНК. У мышей, получивших одновременно с заражением ВГА AgNPs, уровень содержания белка СОД1 и его энзиматическая активность восстанавливаются. Обработка AgNPs мышей, зараженных ВГА, не влияет на видовой состав и титр бактерий легочных путей. Из взятых в исследование цитокинов только уровень ИЛ-6, который защищает нейтрофилы мышей от гибели, вызванной вирусной инфекцией, повышался. В экспериментах *in vitro* высокоочищенные препараты Ag-ЦП, в отличие от холо-ЦП, не индуцировали апоптоз интактных нейтрофилов мышей. Предполагается, что AgNPs снижает ВГА-индуцированное снижение

активности СОД1, альтернативное поступление меди в клетку, вероятно необходимое для репродукции ВГА, снижает уровень цитокинов, освобождаемых нейтрофилами.

**Теоретическая и практическая значимость работы** может быть суммирована в следующих тезисах. **Во-первых**, результаты, полученные в исследовании, расширяют теоретические представления о связях стратегии генома ВГА с базовыми метаболическими процессами хозяина. Так, они демонстрируют, что репродукция ВГА предусматривает модификацию гомеодинамики меди в легких. Модификация включает повышение уровня экспрессии гена прионового белка и смещение сплайсинга первичного продукта транскрипции гена ЦП в сторону формирования ЦП-мРНК, кодирующей синтез ГФИ-ЦП. Благодаря этому в клетках легочного эпителия повышается вирус-опосредованная концентрация эндоцитированной меди. **Во-вторых**, между ПСМ и снижением летальности от вирусной инфекции существует причинно-следственная связь. Она состоит в том, что в отсутствие холо-ЦП не индуцируется гибель нейтрофилов, что может предотвращать развитие цитокинового шторма. Практическая ценность работы состоит в том, что AgNPs могут оказаться перспективными агентами для снижения тяжести течения гриппозной инфекции. **Наконец**, развернутая характеристика *in vitro* и *in vivo* высокопатогенного к мышам штамма ВГА, A/South Africa/3626/2013, идентификация в его геноме полиморфизмов, ассоциированных с повышенной иммуногенностью, расширяют экспериментальную базу для создания новых вакцин и противогриппозных препаратов.

**Методология исследования.** Задачи для достижения поставленной цели решались с помощью изучения влияния дефицита меди на репродукцию ВГА и течение гриппозной инфекции с использованием классических методов вирусологии, позволяющих оценить патогенность вируса ВГА, его токсичность, скорость размножения, чувствительность к температуре, антигенную активность. С другой стороны, изменения метаболизма меди хозяина, зараженного вирусом гриппа и получающим AgNPs в качестве агента снижающего ПСМ, были оценены с помощью комплексного подхода, позволяющего установить активность генов, участвующих в метаболизме меди, на уровне транскрипции, трансляции и формирования зрелых купроэнзимов.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Выбран новый модельный штамм вируса гриппа современной антигенной структуры A/South Africa/3626/2013 (H1N1)pdm09, который обладает тремя уникальными штамм-специфическими заменами в генах, кодирующих белки полимеразного комплекса и по патогенности не уступающий модельному вирусу PR8.
2. Донором меди/серебра для клеток легкого является церулоплазмин. В легких, в отличие от клеток печени, введение AgNPs вызывает повышение активности генов метаболизма меди.
3. Продолжительность жизни мышей, зараженных вирусом SA, увеличивается на фоне снижения показателей статуса меди, вызванного

предварительным внутрибрюшинным введением AgNPs. Механизм этого увеличения не связан ни с прямым воздействием AgNPs на репликацию вируса, ни на микрофлору дыхательных путей мышей.

4. Одним из механизмов защиты AgNPs от гриппозной инфекции является противодействие влиянию вируса на активность генов, кодирующих белки внутриклеточного транспорта меди и белки, связывающие внеклеточную медь.

5. Ag-церулоплазмин теряет способность индуцировать апоптоз нейтрофилов.

#### **Достоверность представляемых результатов**

Достоверность результатов обеспечена адекватностью применяемых методов, соответствующих цели и задачам исследования, показанной в работе воспроизводимостью результатов, а также данными статистической обработки. Все исследования выполнены на верифицированном современном оборудовании с использованием высококачественных реагентов.

#### **Апробация работы**

Результаты исследования были доложены на следующих научных мероприятиях: IV Всероссийская научная конференция молодых ученых “Медико-Биологические Аспекты Химической Безопасности” (Санкт-Петербург, 2020), III инновационный петербургский медицинский форум, (Санкт-Петербург, 2020), Труды 63-й Всероссийской научной конференции МФТИ, (Москва 2020), Наука СПбГУ– 2020, (Санкт-Петербург, 2020) LifeSciencePolytech, (Санкт-Петербург 2021), XXVIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», (Москва, 2021), Всероссийская конференция молодых ученых, посвященная 120-летию со дня рождения академика А. А. Смородинцева, (Санкт-Петербург 2021), 25-ая Международная школа-конференция молодых ученых «Биология-наука XXI века» (Пушино 2022) XXV Кашкинские Чтения, (июнь 2022), X Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов (Новосибирск, 2023), Международный Конгресс "VIII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 300-летию российской науки и высшей школы". (Саратов 2024), Corper 2024 (Неаполь, Италия 2024), IX Всероссийская научная конференция «Клинические и теоретические аспекты Современной медицины» (Москва, 2024).

**Основное содержание диссертации** опубликовано в 6 статьях. Все в изданиях, рецензируемых Web of Science или Scopus, из них 5 в журналах Q1 и обсуждено на 13 всероссийских и международных конференциях.

**Личный вклад автора** является определяющим в разработке концепции существования связи между статусом меди и гриппозной инфекции, выбора и характеристики модельного штамма, а также в получении данных о динамике распределения серебра наночастиц при различных способах их введения мышам, зараженным ВГА. Автор самостоятельно получил данные об активности генов, контролирующих доставку меди к местам формирования купроэнзимов, на разных уровнях экспрессии. Он также определил связь

между статусом меди и активностью внутриклеточных и внеклеточных купроэнзимов у мышей, зараженных ВГА и обработанных AgNPs. Автор лично осуществил сбор и анализ литературы, выполнил статистическую обработку, проанализировал полученные данные, интерпретировал их и сделал обоснованные выводы.

**Связь с базовыми научными программами** осуществлялась течение 2021–2025 гг. при поддержке грантов РФ для молодых ученых № 20-74-10087 с продлением до 2025 г. и гранта РФ № 22-24-00762, а также субсидиями по Госзаданиям № FGWG-2025-0021 и № ЕГИСУ 225021310232-9.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 142 стр., включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов, изложение результатов с их обсуждением, заключение, выводы, список сокращений и список цитированной литературы, включающий 250 источников, из которых 41 являются отечественными. Она иллюстрирована 43 рисунками и содержит 5 таблиц. Диссертация содержит раздел Приложение, состоящий из списка ВГА H1N1, которое включает 134 штамма, использованных для проверки уникальности мутаций, обнаруженных в SA штамме, а также 9 рисунков, иллюстрирующих филогенетические деревья генов ВГА.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ** содержит современное представление о механизме реализации вирусного генома, молекулярно-генетической системе поддержания баланса меди у млекопитающих. В нем представлен анализ данных, свидетельствующих о связи между метаболизмом меди и гриппозной инфекцией, а также биохимические основы использования AgNPs для модуляции ПСМ в сыворотке крови млекопитающих.

**Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** Приведен полный перечень использованных реактивов, наборов и приборов с указанием производителей. В работе использованы такие экспериментальные подходы, как эксперименты пульс-чейз типа для слежения перемещения серебра наночастиц в организме мышей, а также распределение и аккумуляция его при регулярном введении. Разработана схема введения AgNPs и заражения вирусом, позволяющая AgNPs эффективно влиять на статус меди у мышей, зараженных ВГА. В список использованных методов входят как классические вирусологические методы (титрования вирусов, определение (*ts/non-ts* и *ca/non-ca* фенотипы вирусов, определение термостабильности гемагглютинаина, и определение летальных и инфекционных доз вирусов), так и методы молекулярной и клеточной биологии: определение первичной структуры вирусного генома, количественная ПЦР, иммуноблоттинг, выделение клеток крови, изолирование субклеточных фракций, оценка апоптоза и др. Используются также методы современной биохимии и биофизики: ИФА, ионно-обменная хроматография и гель-фильтрация, колориметрические методы энзимологии и прямое определение активности ферментов в геле, спектрофотометрическая и электрофоретическая оценка

чистоты препаратов белков и нуклеиновых кислот, атомно-абсорбционная спектроскопия. Широко использованы методы молекулярной эволюции, статистики и биокомпьютерного анализа. Препарат AgNPs охарактеризован с помощью современных физических методов (сканирующая и трансмиссионная электронная микроскопия, лазерная дифрактометрия, энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии, UV/vis-сканирование и др.). В работе использовали препарат сферических AgNPs с линейным размером 30–50 нм, не содержащий ионное серебро, а также формирующий при спектрофотометрическом сканировании единственную полосу поглощения с максимумом в области  $\sim 400$  нм. Работа с животными проводилась в соответствии с протоколом № 1/20 от 27 февраля 2020 года, одобренного локальным этическим комитетом ИЭМ, Санкт-Петербург, Россия.

### Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**3.1. Поиск модельного штамма ВГА для заражения мышей** Поскольку используемые в настоящее время адаптированные к мышам модельные вирусы, устарели и антигенно отличаются от циркулирующих вирусов, а процесс адаптации занимает много времени и усилий, был проведен поиск неадаптированного модельного вируса гриппа H1N1pdm09, так как некоторые из них могут вызывать заболевание у мышей без предварительной адаптации. Поэтому двадцать один штамм из ВГА H1N1pdm09 (см. список сокращений) были проанализированы, на возможность использовать их в качестве модельных вирусов. Данные, представленные на рисунке 1, показывают, что штамм A/South Africa/3626/2013 (в дальнейшем вирус SA) обладает самой высокой патогенностью среди протестированных вирусов ( $LD_{50} = 4.8 \log_{10}$  ЭИД<sub>50</sub>/мл).

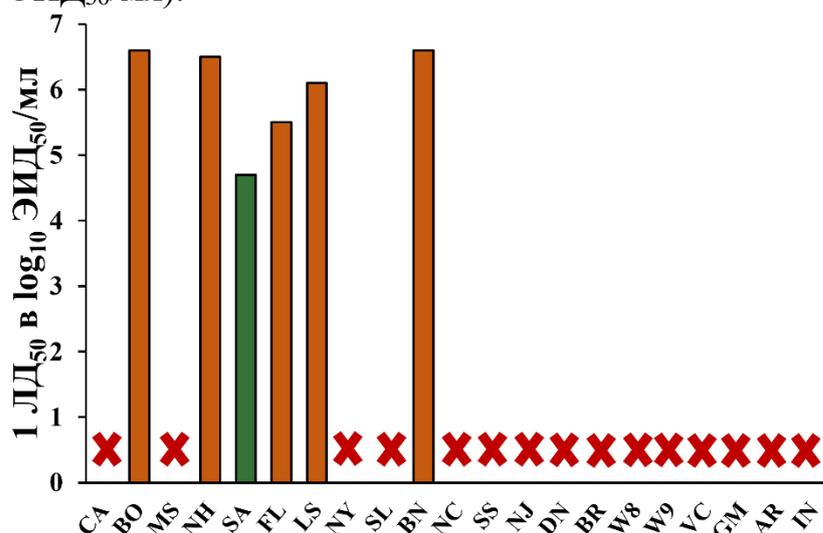


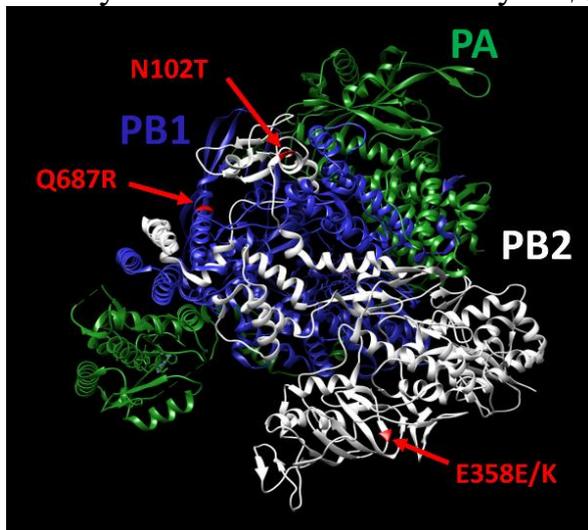
Рисунок 1. LD<sub>50</sub> тестируемых вирусов. Летальность мышей учитывали в течение 14 дней после заражения мышей 10-кратными разведениями тестируемых вирусов. Обозначения: зеленый – высокая патогенность; оранжевый – низкая патогенность; красный крест – отсутствие патогенности).

Сравнение вируса SA как перспективного кандидата в качестве модельного с адаптированным модельным штаммом PR8 показало (Табл. 1), что вирус SA имеет характеристики, сходные с таковыми у вируса PR8, поэтому может быть использован для оценки потенциальных противовирусных и антиоксидантных препаратов и кандидатов на вакцины.

**Таблица 1.** Сравнение инфекционных свойств штамма SA и модельного штамма PR8.

Вирус	МИД <sub>50</sub> log <sub>10</sub> ЭИД <sub>50</sub> /мл	ЛД <sub>50</sub> log <sub>10</sub> ЭИД <sub>50</sub> /мл	Токсичность	Титр в легких, log <sub>10</sub> ЭИД <sub>50</sub> /мл/г	ts фенотип
PR8	1	4,7	70%	8,8 ± 0,5	<i>non-ts</i>
SA	0,8	4,8	73%	8,9 ± 0,3	<i>non-ts</i>

Особенности генома вируса SA были выявлены при сравнительном анализе первичной структуры всех вирусных белков 21 исследованного штамма ВГА H1N1pdm09. Замен, которые присутствуют у всех патогенных штаммов, но отсутствуют у апаатогенных, не выявлено. Однако высокопатогенный штамм SA, по сравнению с другими 20 исследованными штаммами, имеет три уникальные замены, расположенные в полимеразном комплексе, а именно Q687R в PB1 субъединице N102T в PB2 субъединице и одну гетерогенную замену E358E/K также в PB2 субъединице (Рис. 2).

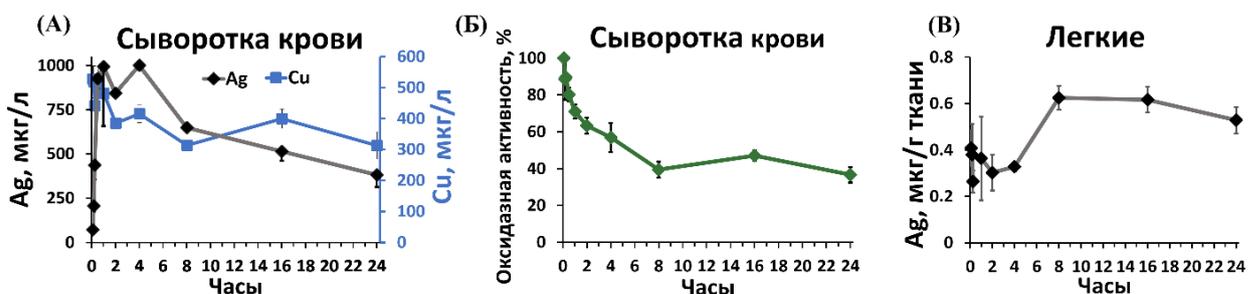


**Рисунок 2.** Трехмерная структура полного полимеразного комплекса вируса SA. Стрелками указаны замены: уникальные Q687R и N102T и гетерогенная E358E/K. Для построения 3D-структуры использован приложение UCSF Chimera 1.15.

Обнаруженные в полимеразном комплексе замены не были найдены также в геномах еще 134 штаммов ВГА (H1N1)pdm09, выделенных в период с 2009 по 2021 год и доступных на платформе GISAID.

### 3.2. *In vivo* влияние AgNPs на репродукцию вируса SA.

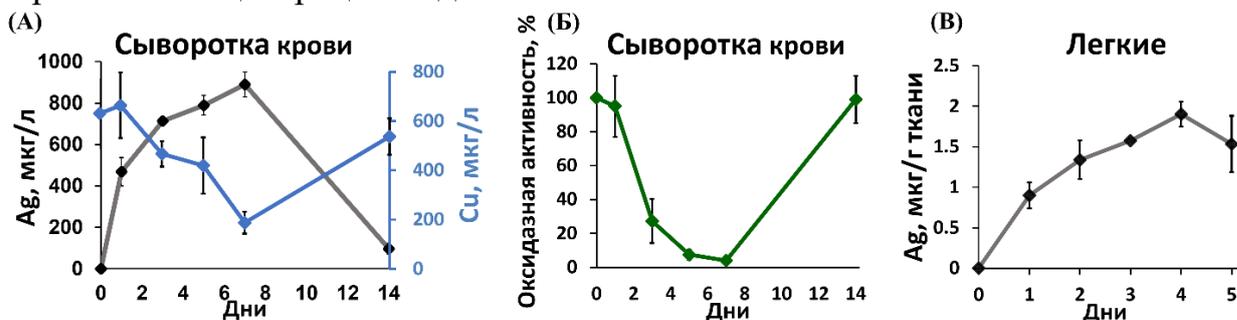
3.2.1. Изучение механизма доставки серебра наночастиц в легкие включало эксперименты пульс-чейз типа, позволяющие проследить за перемещением серебра в организме мышей, и опыты с регулярным (инъекции в течение 7 дней 1 раз в сутки) внутрибрюшинном (в/б) введением AgNPs, результаты показывают, что в кровотоке серебро появляется уже через несколько минут после инъекции, достигает максимума примерно через 40 мин и затем снижается. После введения AgNPs концентрация меди начинает снижаться через 2 часа и падает на 50% к 8-му часу эксперимента (Рис. 3А). Снижение оксидазной активности в сыворотке крови во времени полностью совпадает с кривой, описывающей падение концентрации меди (Рис. 3Б). При этом концентрация серебра в легких достигает своего пика через 8 часов после инъекции AgNPs (Рис. 3В).



**Рисунок 3.** (А) Динамика изменения содержания меди и серебра в сыворотке крови мышей после однократного введения AgNPs. (Б) Время-зависимое изменение оксидазной активности в сыворотке крови. (В) Динамика поступления серебра в легкие.

Таким образом, полученные данные позволяют считать, что транспортером серебра в легкие является Ag-ЦП.

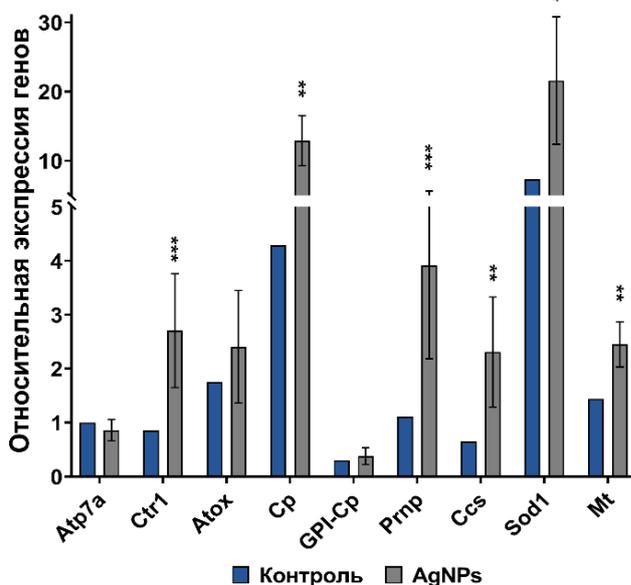
У мышей, получавших инъекции AgNPs регулярно, концентрация серебра в сыворотке крови резко возрастает после первых двух инъекций, а затем умеренно повышается после остальных инъекций и достигает своего пика на 7-й день. Через 7 дней после отмены инъекций концентрация серебра в сыворотке крови снижается примерно в 20 раз (Рис. 4А). В сыворотке крови этих же мышей на фоне роста концентрации серебра содержание меди прогрессивно снижается и восстанавливается после отмены инъекций AgNPs (Рис. 4А). При этом оксидазная активность ЦП падает до нуля на пике накопления серебра и минимуме содержания меди, а затем полностью восстанавливается вместе с восстановлением содержания меди (Рис. 4Б). В течение этого эксперимента в легких нарастает содержание серебра (Рис. 4В). Его концентрация, по сравнению с этим же показателем для печени, почти в 25 раз ниже (50 мкг Ag/г печеночной ткани *versus* 2 мкг Ag/г легочной ткани). При этом концентрация меди в легочной ткани не меняется.



**Рисунок 4.** Изменение концентрации серебра, меди (А) и оксидазной активности (Б) в сыворотке крови мышей в течение регулярных введений AgNPs и через 7 дней после их отмены. (В) Динамика накопления серебра в легочной ткани в течение регулярных введений AgNPs.

В совокупности данные, представленные на рисунках 3 и 4, обеспечили понимание последствий в/б введений AgNPs для метаболизма меди в легких и позволили создать протокол для модуляций ПСМ с помощью инъекций AgNPs, по которому, для достижения низких ПСМ введение AgNPs начинали за 5 дней до заражения вирусом SA.

3.2.2. Особенности экспрессии генов, контролирующих гомеостаз меди в легких, и влияние на их активность AgNPs. Так как система, обеспечивающая гомеостаз меди в легких, изучена недостаточно, вначале был изучен профиль экспрессии этих генов, уровень их активности и влияние на неё низких ПСМ, вызванный инъекциями AgNPs. Для оценки метаболизма меди в легких были выбраны гены, кодирующие: **CTR1**, основной транспортер меди 1 из внеклеточного пространства через плазматическую мембрану в цитозоль; **АТР7А**, медь-транспортная АТФаза, передающая медь из цитозоля в люмен аппарата Гольджи, где участвует в металлировании секреторных купроэнзимов и выведении меди из клеток негепатоцитарных рядов; **АТР7В**, медь-транспортная АТФаза гомологичная АТР7А, но экспрессирующаяся главным образом в печени взрослых млекопитающих; **АТОХ1**, цитозольный Cu-шаперон, передающий медь от CTR1 на АТР7А/В. В рассмотрение были также взяты гены, кодирующие купроэнзимы: внеклеточный растворимый белок ЦП, сочетающий свойства ферроксидазы и транспортера меди, и его сплайс-форма – ГФИ-ЦП; а также **СОД1**, убиквитический цитозольный купроэнзим, и **ССС**, Cu-шаперон, встраивающий медь в ее активный центр. В дополнение был взят ген, кодирующий металлотронеин 1, связывающий  $\text{Cu}^{1+}/\text{Ag}^{1+}$ , и прионный белок, **PrP**, участвующий в метаболизме меди. Полученные результаты показывают, что в легких, формируются обе сплайс-формы ЦП-мРНК (Рис. 5), а из медь-транспортных АТФаз преимущественно экспрессируется ген *Atp7a*. Уровень экспрессии гена *Atp7b* более, чем в 60 раз ниже, чем *Atp7a*, поэтому на Рис. 5 он не представлен. В легких мышей с низкими ПСМ экспрессия генов *CTR1* и *Cp* (ЦП), *SOD1* и *ССС*, а также металлотронеина 1 (*MT1*) и *Prnp* повышается (Рис. 5).

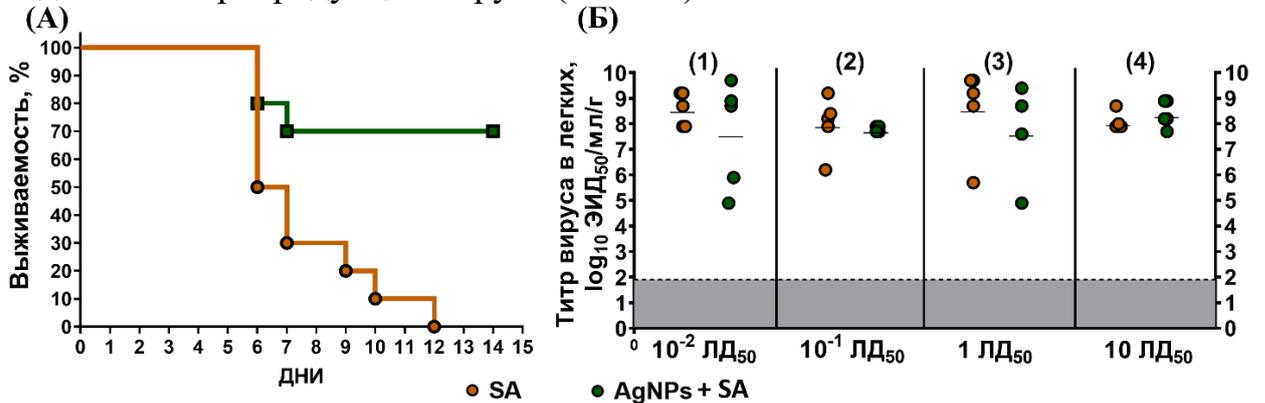


**Рисунок 5.** Влияние AgNPs на экспрессию генов метаболизма меди в легких. Интактные мыши – голубой; Ag-мыши – серый, данные сравнивали с использованием непарного t-критерия с поправкой Уэлча.

### 3.2.3. Влияние AgNPs на патогенность вируса SA

Для оценки влияния AgNPs на летальность мышей от вирусной пневмонии мышей с низкими ПСМ заражали 10 ЛД<sub>50</sub> вируса SA и учитывали их гибель в течение 14 дней. Выживаемость мышей с низкими ПСМ была значительно

выше, чем у животных контрольной группы. К тому же продолжительность жизни мышей, зараженных вирусом SA и не получавших инъекции AgNPs, составляла 7,5 дней, в то время как у мышей зараженных вирусом SA и получавших AgNPs, она повышалась до 11,7 дней (Рис. 6А). Однако, как показали результаты опытов по определению скорости репродукции вируса в нижних дыхательных путях, повышение выживаемости и увеличение продолжительности жизни мышей группы (AgNPs+SA) не связаны с подавлением репродукции вируса (Рис. 6Б).



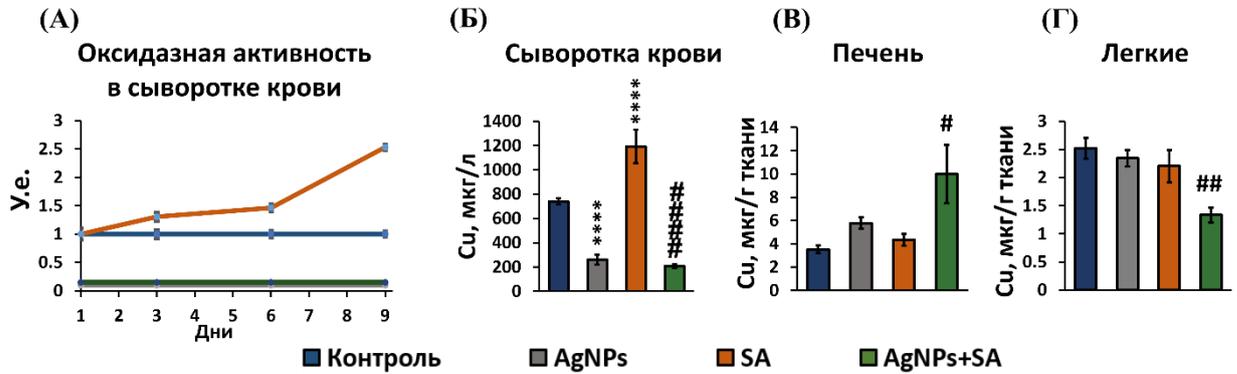
**Рисунок 6.** Влияние AgNPs на патогенность вируса SA. (А) Летальность мышей, зараженных вирусом SA с введением AgNPs и без него, для количественной оценки выживаемости использовали критерий Log-rank (Mantel-Cox). (Б) Репродукция вируса SA в легких мышей. (1-4): дозы вируса от 10<sup>-2</sup> ЛД<sub>50</sub> до 10 ЛД<sub>50</sub>. Серая зона: порог обнаружения, данные репродукции вируса сравнивали при помощи непарного t-критерия с поправкой Уэлча.

### 3.2.4. Исследование роли ПСМ в снижении летальности мышей

Исследование включало: (1) измерение ПСМ в сыворотке мышей группы (AgNPs+SA) и концентрации меди и серебра в печени и легких мышей исследованных групп; (2) определение активности генов метаболизма меди в легких мышей этой группы на уровне транскрипции, трансляции и формирования зрелых купроэнзимов.

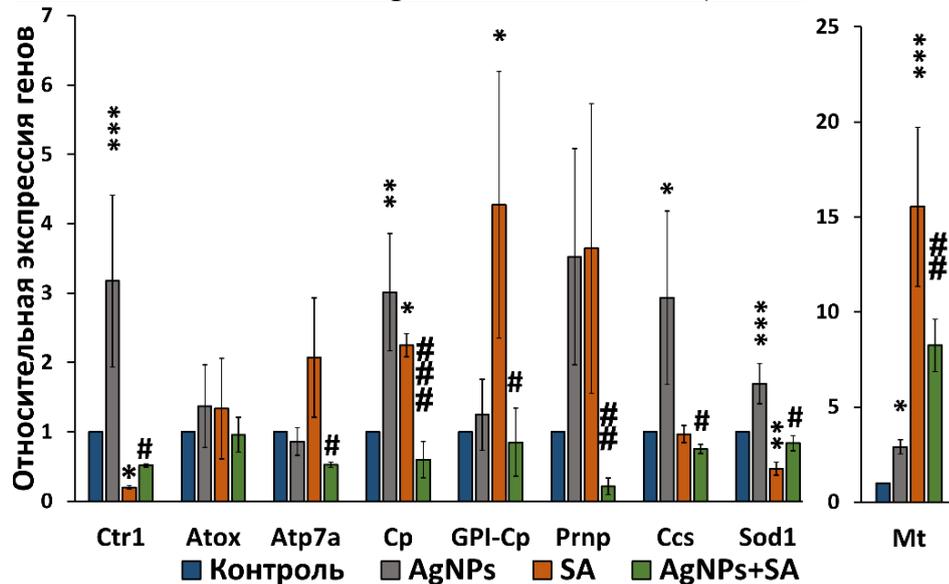
(1). Оксидазная активность и концентрация меди были измерены у мышей четырех групп: контроль – интактная группа; AgNPs – мыши получали инъекции AgNPs; SA – мыши, зараженные вирусом SA; (AgNPs+SA) – мыши, зараженные вирусом SA, на фоне обработки AgNPs в течение всего эксперимента. Измерения оксидазной активности проводили каждые 3 дня со дня заражения до 9-го дня, у мыши кровь не отбирали чаще, чем 1 раз в 6 дней. Данные показывают что заражение вирусом SA, приводит к повышению оксидазной активности примерно в 2.5 раза (Рис. 7А). У мышей, обработанных AgNPs, уровень оксидазной активности был ниже детектируемого на протяжении всего эксперимента и оставался таким же после заражения (Рис. 7А). При этом концентрация меди в сыворотке мышей всех групп строго коррелировала с оксидазной активностью (Рис. 7Б). Ни обработка AgNPs, ни заражение вирусом SA не влияют на содержание меди в печени и легких (Рис. 7Б и В). Однако, в печени мышей группы (AgNPs+SA) концентрация меди повышается (Рис. 7Б), в то время как в легких она снижается (Рис. 7В). Заражение вирусом SA на фоне введения AgNPs не влияло на концентрацию

серебра в сыворотке крови мышей. Содержание серебра изменяется с той же тенденцией, что и концентрация меди, в печени мышей (AgNPs+SA) повышается, по сравнению с мышами группы (AgNPs), а в легких при аналогичном сравнении снижается. Однако из-за высокой вариабельности внутри группы эти изменения не значимы (для анализа этих данных был использован непарный *t*-критерий с поправкой Уэлча).



**Рисунок 7.** Роль ПСМ в снижении летальности мышей. **(А)** AgNPs-индуцированная потеря оксидазной активности в сыворотке мышей. По оси абсцисс: дни после заражения; по оси ординат: у.е. ( $n=6$ ). **(Б)** Концентрация меди в сыворотке крови, **(В)** печени и **(Г)** легких ( $n=5$ ). Данные обработаны с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием апостериорного теста Тьюки для множественных сравнений  $****P < 0,0001$  по сравнению с контролем,  $\#P < 0,05$ ;  $###P < 0,005$ ;  $####P < 0,0001$  взаимодействие между двумя факторами (SA и AgNPs).

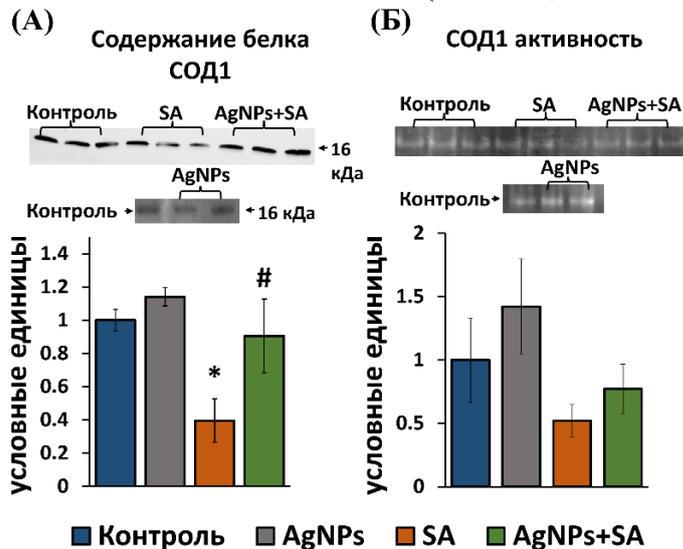
(2). В следующей серии экспериментов в легких мышей исследуемых групп, оценивали активность генов, участвующих в метаболизме меди. В части работы исследованы гены, перечисленные в разделе 3.2.2 (Рис. 5). Результаты показывают, что концентрации мРНК, программирующих синтез АТР7А, ЦП, ГФИ-ЦП, МТ1 и РrР, увеличиваются в легких SA-мышей и снижаются в группе (AgNPs+SA) (Рис. 8). Напротив, уровень мРНК, кодирующих СТР1 и СОД1 подавляется вирусом SA, однако, при обработке AgNPs их экспрессия восстанавливается, особенно содержание СОД1-мРНК, концентрация которой восстанавливается почти до контрольных значений (Рис. 8).



**Рисунок 8.** Влияние AgNPs и вирусной инфекции на активность генов, метаболизма меди в легких. Обозначения генов и групп мышей, как на рисунке 5. Статистическая обработка проводилась при помощи двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием апостериорного теста Тьюки для множественных сравнений  $*P < 0,05$ ;  $**P < 0,005$ ;  $***P < 0,0005$  по сравнению с контролем,  $\#P < 0,05$ ;  $\#\#P < 0,005$ ;  $\#\#\#P < 0,0005$  взаимодействие между двумя факторами (SA и AgNPs).

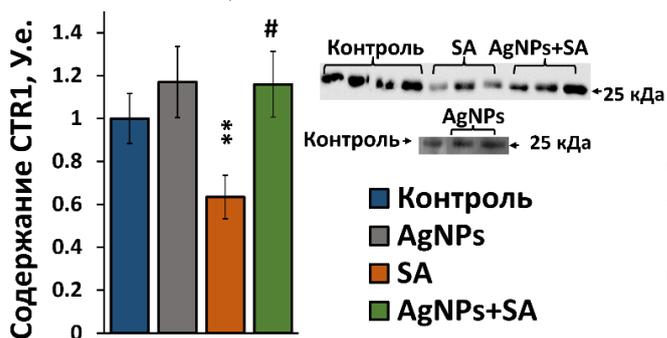
Вероятно, что у мышей группы (AgNPs+SA), экспрессия провирусных генов хозяина подавляется, а экспрессия противовирусных генов активируется. Обращает на себя внимание эффект AgNPs на экспрессию выбранных генов в легких мышей, зараженных вирусом SA (Рис. 8). Видно, что низкие ПСМ, индуцированные AgNPs, противодействуют влиянию вируса SA на активность генов, связанных с метаболизмом меди.

Оценка влияния AgNPs на уровне трансляции и ферментативной активности СОД1 у мышей исследуемых групп, показала, что вирус снижает как содержание иммунореактивных полипептидов СОД1 (Рис. 9А), так и ее активность (Рис. 9Б). Однако у мышей, зараженных вирусом SA на фоне обработки AgNPs, восстанавливается синтез СОД1, а ее активность имеет тенденцию к повышению (Рис. 9Б).



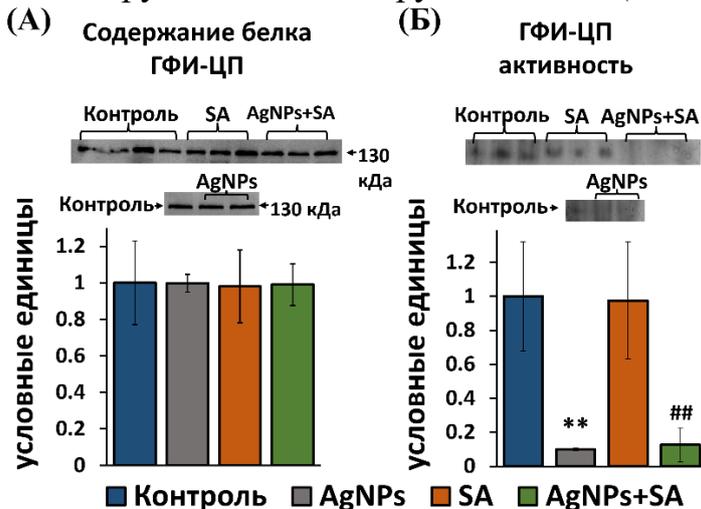
**Рисунок 9.** Относительное содержание иммунореактивных полипептидов СОД1 (А) и ее активность (Б) у исследованных групп мышей. Статистическая обработка данных проводилась при помощи двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием апостериорного теста Тьюки для множественных сравнений  $*P < 0,05$ ; по сравнению с контролем,  $\#P < 0,05$  взаимодействие между двумя факторами (SA и AgNPs).

По данным иммуноблотинга концентрация иммунореактивных полипептидов CTR1 снижается у мышей, зараженных вирусом SA, и восстанавливается после обработки AgNPs (Рис. 10). Содержание белка CTR1 у мышей, получавших AgNPs, не отличается от такового у контрольных мышей, что не коррелирует с повышением активности гена CTR1, вызванное AgNPs (Рис. 8 versus Рис. 10).



**Рисунок 10.** Относительное содержание иммунореактивных полипептидов CTR1 у мышей, зараженных вирусом SA и обработанных AgNPs.  $**P < 0,005$ ; по сравнению с контролем,  $\#P < 0,05$  взаимодействие между двумя факторами (SA и AgNPs).

В составе тотальной РНК, экстрагированной из легких, мы нашли обе сплайс-формы ЦП-мРНК, кодирующие секреторный ЦП, и ЦП, связанный с клеточной мембраной через ГФИ-якорь (Рис. 11). Содержание иммунореактивного ЦП, связанного с мембраной, не меняется (Рис. 11А). Однако его оксидазная активность падает при обработке AgNPs, независимо от того, заражены ли мыши вирусом SA, или нет (Рис. 13Б). Это свидетельствует о том, что серебро, доставленное в легочные клетки Ag-ЦП, включается в метаболизм меди в этих клетках. Данные, приведенные на рисунке 11, впервые однозначно демонстрируют, что в клетках легких синтезируется и металлируется ГФИ-ЦП.



**Рисунок 11.** (А) Относительное содержание иммунореактивных полипептидов ГФИ-ЦП во фракции плазматических мембран легочных клеток мышей. (Б) Оксидазная активность в этих же субклеточных фракциях.  $**P < 0,005$ ; по сравнению с контролем,  $##P < 0,005$ ; взаимодействие между двумя факторами (SA и AgNPs).

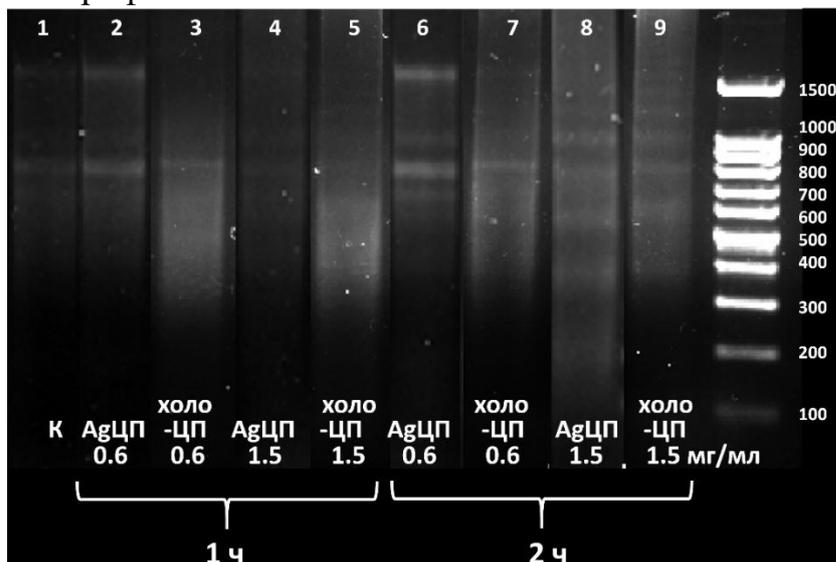
Определить содержание иммунореактивных полипептидов секреторного ЦП и его энзиматическую активность, как продуктов биосинтетической активности клеток легких *in vivo* затруднительно, так как во внеклеточной жидкости невозможно отличить ЦП, синтезированный легочными клетками, от ЦП печеночного происхождения. Совокупность представленных данных можно трактовать в пользу предположения, что дефицит церулоплазминовой меди, вызванный введением AgNPs, может быть причиной снижения летальности мышей, зараженных вирусом SA.

3.2.5. В качестве возможных механизмов снижения смертности в группе мышей (AgNPs+SA) были рассмотрены следующие: (1) серебро, аккумулированное в легких мышей группы (AgNPs+SA) подавляет рост бактерий, которые могли бы участвовать в развитии пневмоний в легких; (2) Ag-ЦП, в отличие от холо-ЦП, теряет способность индуцировать апоптоз нейтрофилов; (3) низкие ПСМ могут влиять на уровень цитокинов в сыворотке крови Ag-мышей, зараженных вирусом SA.

(1) Чтобы изучить, связано ли противовирусное действие AgNPs с их способностью прямо оказывать антибактериальное действие, у пяти мышей из каждой группы были взяты образцы легких на шестой день после заражения вирусом SA. Гомогенат каждого легкого титровали на двух питательных агарах (Колумбийский агар и ЛБ-агар). Результаты показали, что введение AgNPs не влияли на общую бактериальную обсеменённость легких мышей. К тому же идентифицированные клоны, доминирующие в контрольной группе,

были доминирующими во всех других группах. Следовательно, в легких мышей группы (AgNPs+SA) нет серебра, способного демонстрировать антибактериальные свойства.

(2) Известно, что холо-ЦП вызывает апоптоз нейтрофилов, однако, ни его фрагменты, или денатурированные формы, не обладают этим свойством. Так как пространственная структура Ag-ЦП нарушена и близка к расплавленной глобуле, была проверена способность Ag-ЦП индуцировать апоптоз нейтрофилов, который осложняет течение инфекции. Для этого холо-ЦП и Ag-ЦП были выделены из сыворотки крови интактных мышей и мышей, которым вводили AgNPs в течение 5 дней. Высокоочищенные препараты Ag-ЦП и холо-ЦП были получены с помощью комбинации трех типов хроматографий: ионообменной, аффинной и эксклюзионной. Лейкоциты выделяли из крови интактных мышей, инкубировали с препаратами холо-ЦП и Ag-ЦП в двух различных концентрациях (0.6 или 1.5 мг/мл) в течение двух временных интервалов (1 или 2 часа). После инкубации экстрагировали ДНК и фракционировали ее методом электрофореза в 1.4% агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Холо-ЦП вызывает фрагментацию ДНК во всех образцах (Рис. 14, дорожки 3, 5, 7 и 9), в то время как Ag-ЦП вызывает фрагментацию ДНК только после длительного периода инкубации с высокой концентрацией полипептида (Рис. 14, дорожки 2, 4, 6 и 8). Полученные данные позволяют предположить, что возможной природой противовирусной активности AgNPs является утрата способности Ag-ЦП индуцировать апоптоз нейтрофилов.

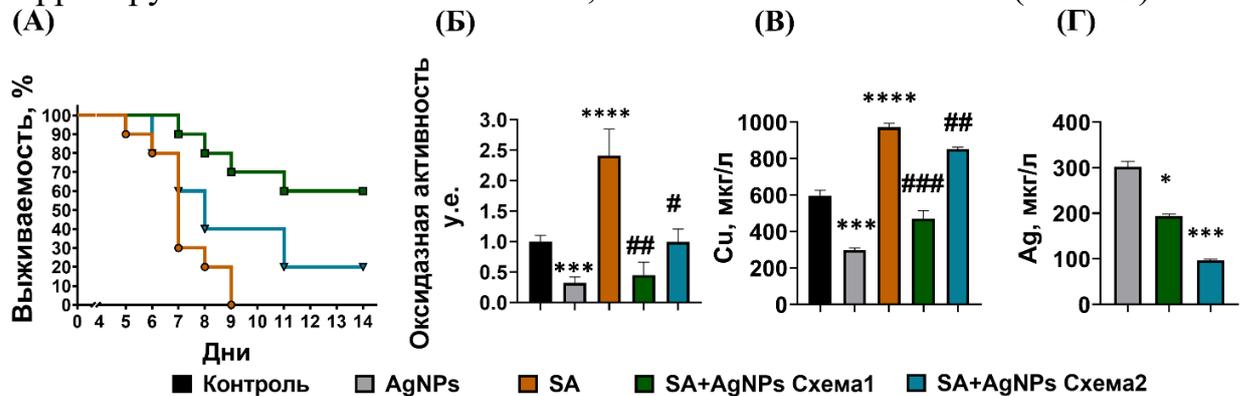


**Рисунок 12.** Электрофорез ДНК после инкубации клеток с холо-ЦП или Ag-ЦП. Инкубация в течение 1 часа: дорожки 2 - 5; и в течение двух часов: дорожки 6 - 9. Инкубация с Ag-ЦП: дорожки 2, 4, 6, и 8; инкубация с холо-ЦП: дорожки 3, 5, 7, и 9.

(3) Руководствуясь тем, что у мышей (AgNPs+SA) ключевым изменением является замещение холо-ЦП на Ag-ЦП, мы измерили концентрацию двух ИЛ: ИЛ6, который участвует в регуляции транскрипции гена ЦП благодаря кластеру из трех активных *цис*-элементов; и ИЛ2, который, не имеет своего *цис*-элемента в промоторной зоне гена ЦП и не отвечает на низкий уровень статуса меди. Результаты измерения концентрации ИЛ2 и ИЛ6 показали, что порознь, ни введение AgNPs, ни заражение вирусом SA, не оказывают влияния ни на концентрацию ИЛ2, ни на концентрацию ИЛ6. Однако концентрация ИЛ6 повышается у мышей группы (AgNPs+SA).

### 3.2.6. Оценка перспективы использовать AgNPs в качестве противовирусного препарата непрямого действия

Чтобы изучить возможность использовать AgNPs в качестве средства для лечения гриппозной инфекции, мышей обработали AgNPs, концентрация которых была снижена в 10 раз (0,2 мг *versus* 2,0 мг AgNPs на 1 кг массы тела) по двум схемам. По схеме 1, которая была использована на предыдущих этапах исследования, где AgNPs начинали вводить за 4 дня до заражения вирусом и продолжали введения до конца эксперимента. По схеме 2, AgNPs начинали вводить сразу после заражения вирусом и продолжали до конца эксперимента. Для заражения интраназально вводили 10 ЛД<sub>50</sub> вируса SA. Для оценки влияния AgNPs на выживаемость мышей от пневмонии наблюдение осуществляли в течение 14 дней ( $n = 10$ ). Обработка мышей, зараженных вирусом SA, наночастицами по схеме 2 подавляла инфекционный процесс, вызванный вирусом SA, но она показала менее выраженный эффект, по сравнению со схемой 1 (Рис. 13А). Выживаемость мышей в обеих группах обратно коррелирует с ПСМ: чем ниже ПСМ, тем выше выживаемость (Рис. 13).



**Рисунок 13.** Связь между степенью снижения ПСМ и патогенностью вируса SA. (А) Выживаемость мышей, для количественной оценки использовали критерий Log-rank (Mantel-Cox),  $P = 0.0005$ ,  $P = 0.0408$  для схем 1 и 2, соответственно. (Б) оксидазная активность; (В) концентрация меди и (Г) серебра в сыворотке крови. Данные обработаны с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием апостериорного теста Тьюки для множественных сравнений  $*P < 0,05$ ;  $**P < 0,005$ ;  $***P < 0,0005$ ;  $****P < 0,0001$  по сравнению с контролем,  $\#P < 0,05$ ;  $\##P < 0,005$ ;  $\###P < 0,0005$ ;  $\####P < 0,0001$  взаимодействие между двумя факторами (SA и AgNPs). Для анализа данных по серебру был использован непарный t-критерий с поправкой Уэлча.

Эти данные демонстрируют прямую корреляцию между уровнем снижения показателей статуса меди и уровнем защиты от гриппозной инфекции, а также иллюстрируют потенциал использования AgNPs в качестве противовирусного лекарственного средства непрямого действия.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для изучения влияния статуса меди на репродукцию вируса гриппа и течение гриппозной инфекции у мышей, зараженных ВГА, были проведены два подготовительных исследования. Первое посвящено выбору и характеристике из циркулирующих ВГА штаммов, подходящего на роль модельного, второе – изучению механизма влияния AgNPs, приготовленных и охарактеризованных нами, на метаболизм меди в легких.

**Выбор модельного штамма** осуществлен из 21 циркулирующего штамма ВГА. Вирус SA без предварительной адаптации обладает способностью заражать лабораторных животных, эффективно размножаться в легких и демонстрирует высокую патогенность, которая объясняется тремя уникальными аминокислотными заменами в полимеразном комплексе этого штамма: Q687R в PB1 субъединице и N102T в PB2 субъединице, а также одна гетерогенная замена E358E/K в PB2 субъединице. Сравнение штамма SA с модельным штаммом PR8 показывает, что штамм вируса SA можно использовать для оценки потенциальных противовирусных препаратов.

**Основная часть работы** выполнена на выбранном модельном штамме ВГА и охарактеризованных AgNPs. Тестирование AgNPs на способность повышать выживаемость мышей, зараженных вирусом SA, показала их высокую эффективность. Детальная проверка способа введения AgNPs, динамики поступления серебра наночастиц в легкие, его накопление и выведение была осуществлена в экспериментах пульс-чейз типа и в опытах, в которых AgNPs вводили ежедневно до снижения оксидазной активности ЦП до нуля.

У мышей, зараженных ВГА, обнаружено два звена, которые изменяются обработкой AgNPs. Во-первых, в *легких* заражение вирусом гриппа вызывает подавление активности генов *Ctrl* и *Sod1*, что необходимо для повышения уровня АФК, являющегося критичным для освобождения вирусного генома. С другой стороны, повышается активность гена *Atp7a*, передающего медь в люмен аппарата Гольджи, и генов, кодирующих секреторные медьсодержащие белки: ЦП, ГФИ-ЦП, PrP. Это отражает ответ клетки-хозяина на вирусную инфекцию: ЦП является белком острой фазы, а прионовый белок – альтернативный донор меди для СОД1. Таким образом, стратегии и хозяина, и вируса направлены на метаболизм меди.

Обработка AgNPs восстанавливает активность генов *Ctrl* и *Sod1* на всех уровнях экспрессии: производство мРНК, содержание полипептидов и ферментативная активность. В то же время наночастицы противодействуют вирусу, который повышает активность провирусных генов: *Atp7a*, *Cp/GPI-Cp*, *Prnp* и *MT*.

При этом у мышей с низкими показателями статуса меди, летальность, вызванная гриппозной инфекцией, достоверно уменьшается. Можно думать, что существует прямая связь между статусом меди, показатели которого повышаются в несколько раз при заражении вирусом, и снижением летальности в результате AgNP-индуцированной даун-регуляции активности этих генов. Однако этому заключению противоречат данные, показывающие, что у выживающих Ag-мышей титр ВГА в легких не меняется. Следовательно, несмотря на то, что гриппозная инфекция сопряжена с повышением показателей статуса меди, простое снижение метаболизма меди не ведет к подавлению репродукции вируса в легких, несмотря на то, что белки транспорта меди необходимы для репродукции ВГА. Поиск звена, ответственного за AgNP-индуцированное снижение летальности, показал, что низкий статус меди. Характеризуется тем, что в крови Ag-мышей циркулирует Ag-ЦП, который не способен вызывать апоптоз нейтрофилов. Возможно, это

предотвращает цитокиновый шторм. К тому же, у этих мышей достоверно повышается ИЛ-6, известный как антиапоптотический фактор нейтрофилов. Таким образом, AgNPs можно рассматривать в качестве противовирусного препарата непрямого действия.

## ВЫВОДЫ

1. Неадаптированный к мышам штамм вирус гриппа A/South Africa/3626/2013 (H1N1)pdm09 не уступает по патогенности модельному вирусу PR8. Его высокая патогенность может быть обусловлена тремя уникальными заменами в полимеразном комплексе.
2. Донором меди/серебра для клеток легкого является церулоплазмин, и, в отличие от печени, введение мышам AgNPs вызывает повышение активности генов метаболизма меди.
3. Ежедневное внутрибрюшинное введение AgNPs снижает летальность мышей, вызванную вирусом SA, но не подавляет его репродукцию и не влияет на микрофлору легких мышей.
4. У мышей, получавших AgNPs и зараженных вирусом SA, снижается активность генов, кодирующих белки внутриклеточного транспорта меди и белков, связывающих внеклеточную медь, экспрессия которых повышается на фоне гриппозной инфекции.
5. У мышей введение AgNPs восстанавливает концентрацию СОД1-мРНК, иммунореактивных полипептидов СОД1 и энзиматическую активность СОД1, которые подавляются на ранних этапах вирусной инфекции.
6. Замещение холо-церулоплазмина на Ag-церулоплазмин защищает нейтрофилы мышей от апоптоза.

## Список публикаций по теме диссертации

### Статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, или входящих в международные системы цитирования и реферативные базы данных

- 1) **Al Farroukh M.** Understanding the Variability of Certain Biological Properties of H1N1pdm09 Influenza Viruses / M. Al Farroukh, I. Kiseleva, E. Bazhenova [et al.] // *Vaccines*. – 2022. – Vol. 10. – № 3. – P. 395. <https://doi.org/10.3390/vaccines10030395>, (Q1).
- 2) Kiseleva I. V. Non-Mouse-Adapted H1N1pdm09 Virus as a Model for Influenza Research / I. Kiseleva, A. Rekstin, **M. Al Farroukh** [et al.] // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12. – № 6. – P. 590. <https://doi.org/10.3390/v12060590>, (Q1).
- 3) Kiseleva I. V. Anti-Influenza Effect of Nanosilver in a Mouse Model / I. V. Kiseleva, **M. A. Farroukh**, E. A. Skomorokhova [et al.] // *Vaccines*. – 2020. – Vol. 8. – № 4. – P. 679. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040679>, (Q1).
- 4) Magazenkova D. N. Influence of Silver Nanoparticles on the Growth of Ascitic and Solid Ehrlich Adenocarcinoma: Focus on Copper Metabolism / D. N. Magazenkova, E. A. Skomorokhova, **M. A. Farroukh** [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 15. – Influence of Silver Nanoparticles on the Growth of Ascitic and Solid Ehrlich Adenocarcinoma. – № 4. – P. 1099. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041099>, (Q1).
- 5) Puchkova L. V. Shape-dependent biological activity of spherical and quasi-spherical silver nanoparticles in E. coli, A549 cells and mice / L. V. Puchkova, T. P. Sankova, D.

N. Magazenkova, **M. A. Farroukh** [et al.] // Environmental Science: Nano. – 2022. – Vol. 9. – № 9. – P. 3581-3598. <https://doi.org/10.1039/D2EN00402J>, (Q1).

- б) **Аль Фаррух М.** Защитная роль наночастиц серебра при гриппозной инфекции / М. Аль Фаррух, Е.А. Скоморохова, Д.Н. Магазенкова, И.В. Киселева // Медицинский академический журнал. – 2021. – Т. 21. – №3. – С. 81-84. <https://doi.org/10.17816/MAJ76290>, (Scopus).

### **Публикации в других изданиях**

- 1) Kiseleva I. V. In Vivo Study of Anti-Influenza Effect of Silver Nanoparticles in a Mouse Model / I. V. Kiseleva, L. V. Puchkova., **M. Al Farroukh**, E. Puchova. – In Viral and Antiviral Nanomaterials, CRC Press, 2022. – ISBN 978-1-00-313664-4

### **Тезисы, опубликованные по теме диссертации**

- 1) Снижение статус меди как подход для борьбы с вирусом гриппа. **Аль Фаррух М.**, Магазенкова Д.Н., Ильичева Е.Ю., IX Всероссийская научная конференция «Клинические и теоретические аспекты Современной медицины». Москва, 13-14 декабря 2024.
- 2) Механизм противовирусного действия наночастиц серебра, **Аль Фаррух М.**, Магазенкова Д.Н., Скоморохова Е.А., В книге: Международный Конгресс "VIII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 300-летию российской науки и высшей школы". Саратов, 14-19 июня 2024. С. 461.
- 3) Understanding the Antiviral Effect of Silver Nanoparticles, **Mohammad Al Farroukh**, Daria N. Magazenkova, Artem Tkachev, Ludmila V. Puchkova, Irina V. Kiseleva, Ekaterina Y. Puchova, Copper 2024 Неаполь, Италия, 15-19 сентября 2024 г.
- 4) Использование ионов серебра для изучения метаболизма меди млекопитающих, Ильичева Е.Ю., Магазенкова Д.Н., Рекина В.Е., Джассим З.М., **Фаррух М.**, Пучкова Л.В., В книге: X Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов. Сборник тезисов. Новосибирск, 26-29 сентября 2023. С. 631-632.
- 5) Молекулярно-генетическое объяснение высокой патогенности для мышей вируса гриппа А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1) pdm09. **Аль Фаррух М.**, Рекстин А.Р., Баженова Е.А., XXV Кашкинские Чтения, 8-10 июня 2022 г. С. 41.
- 6) Изменчивость биологических свойств вирусов гриппа H1N1pdm09 разных лет выделения, **Аль Фаррух М.**, Баженова Е.А., Киселева И.В., Пучкова Л.В., 25-й Международной школы-конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века», Пушкино, 18-22 апреля 2022 г. С. 6.
- 7) Противогриппозное действие наночастиц серебра в экспериментах на мышах. **Аль Фаррух М.**, Магазенкова Д.Н., Баженова Е.А., Киселева И.В. в Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 120-летию со дня рождения академика А. А. Смородинцева, Санкт-Петербург, 15 апреля 2021 г. С. 8-9.
- 8) Наночастицы серебра защищают мышей от летальной гриппозной инфекции. **Аль Фаррух М.**, XXVIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Москва, 12-23 апреля 2021 г. № 7.
- 9) Пульс-чейз анализ распределения ионов серебра в организме мыши. Магазенкова Д.Н., **Аль Фаррух М.К.**, Ильичева Е.Ю. LifeSciencePolytech, Санкт-Петербург, 25 – 26 ноября 2021 г. С. 56-57
- 10) Низкий уровень холо-церулоплазмينا облегчает течение гриппозной инфекции Наука **Аль Фаррух М.**, Скоморохова Е.А., Рекстин А.Р., Баженова Е.А., Магазенкова Д.Н., Киселева И.В., Наука СПбГУ– 2020, 23 декабря 2020 г. С. 679
- 11) Наночастицы серебра как потенциальный противогриппозный препарат. **Аль Фаррух М.**, Скоморохова Е.А., Магазенкова Д.Н., Баженова Е.А., Рекстин А.Р., Киселева И.В., Пучкова Л.В. Труды 63-й Всероссийской научной конференции МФТИ, Москва, 23–29 ноября 2020 г. С.110-111

- 12) Неадаптированный к мышам вирус H1N1pdm09 как модель для изучения гриппозной инфекции. Аль Фаррух М., Рекстин А.Р., Баженова Е.А., III инновационный петербургский медицинский форум, Санкт-Петербург, 21–23 октября 2020 г. С.256
- 13) Подавление гриппозной инфекции, вызванной у мышей вирусом H1N1pdm09, наночастицами серебра. Аль Фаррух М., Скоморохова Е.А., Рекстин А.Р.1, Баженова Е.А., Магазенкова Д.Н., Руденко Л.Г., Пучкова Л.В., Киселева И.В., IV Всероссийской научной конференции молодых ученых “Медико-Биологические Аспекты Химической Безопасности”, Санкт-Петербург, 16–18 Сентябрь 2020 г. № 58.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

MCM	метаболическая система меди
ВГА	вирус гриппа А
ЦП	церулоплазмин
AgNPs	наночастицы серебра
ПСМ	показателями статуса меди
СОД1	цитозольная супероксиддисмутаза
CA	A/California/07/2009 (H1N1)pdm09
BO	A/Bolivia/559/2013 (H1N1)pdm09
MS	A/Mississippi/10/2013 (H1N1)pdm09
NH	A/New Hampshire/04/2013 (H1N1)pdm09
SA	A/South Africa/3626/2013 (H1N1)pdm09
FL	A/Florida/62/2014 (H1N1)pdm09
LS	A/Laos/1187/2014 (H1N1)pdm09
NY	A/New York/61/2015 (H1N1)pdm09
SL	A/Slovenia/2903/2015 (H1N1)pdm09
BN	A/Bangladesh/3002/2015 (H1N1)pdm09
NC	A/Newcastle/67/2017 (H1N1)pdm09
SS	A/South Australia/272/2017 (H1N1)pdm09
NJ	A/New Jersey/13/2018 (H1N1)pdm09
DN	A/Darwin/123/2018 (H1N1)pdm09
BR	A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09
W8	A/Iowa/59/2018 (H1N1)pdm09
W9	A/Iowa/12/2019 (H1N1)pdm09
VC	A/Victoria/2570/2019 (H1N1)pdm09
GM	A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)pdm09
AR	A/Arkansas/08/2020 (H1N1)pdm09
IN	A/Indiana/02/2020 (H1N1)pdm09
PR8	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)
PB1	основной белок 1 полимеразного комплекса
PB2	основной белок 2 полимеразного комплекса
PA	кислый белок полимеразного комплекса
ЛД <sub>50</sub>	летальная доза для 50% испытуемых
ЭИД <sub>50</sub>	инфицирующая доза для 50% куриных эмбрионов
МИД <sub>50</sub>	инфицирующая доза для 50% мышей
ts	Термочувствительный фенотип ВГА
ca	Холодоадаптированный фенотип ВГА
MT1	металлотионеин 1
у.е.	условные единицы