

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»

На правах рукописи

АЛЬ ФАРРУХ МОХАММАД

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

1.5.10 – Вирусология

1.5.4 – Биохимия

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

Научные руководители:

доктор биологических наук, проф.,

Киселева Ирина Васильевна

доктор биологических наук, проф.,

Пучкова Людмила Валентиновна

Санкт-Петербург, 2025

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ.....	2
1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.....	5
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
2.1. РЕПЛИКАЦИЯ ВИРУСА ГРИППА А.....	13
2.1.1. Морфология ВГА.....	13
2.1.2. Репродукция ВГА	16
2.1.3. Заражение мышей вирусом гриппа	20
2.2. БИОЛОГИЯ МЕДИ.....	24
2.2.1. Химические свойства меди, определяющие ее биоактивность	24
2.2.2. Роль купроэнзимов в метаболизме млекопитающих	24
2.2.3. Роль меди в регуляции клеточной активности у млекопитающих	30
2.2.4. Системы, осуществляющие безопасный круговорот меди в организме взрослых млекопитающих.....	31
2.3. СВЯЗЬ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА ГРИППА И ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ С МЕТАБОЛИЗМОМ МЕДИ ХОЗЯИНА	42
2.3.1. Металлирование СОД1.....	43
2.3.2. Пара АТР7А/аутофагосома.....	44
2.3.3 Импорт и выведение меди.....	45
2.3.4. Прионный белок.....	45
2.3.5. Церулоплазмин.	46
2.3.6. COMMD1	49
2.4. УПРАВЛЯЕМОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СТАТУСА МЕДИ	50
2.4.1. Химические и биологические свойства серебра	50
2.4.2. Механизм интервенции серебра в метаболизм меди и использование AgNPs для управления статусом меди.....	53
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	57
3.1. Материалы, использованные в работе	57

3.1.1. Синтез наночастиц серебра (AgNPs, Silver nanoparticles)	57
3.1.2. Физико-химическая характеристика AgNPs	57
3.2. Биообъекты использованные в работе	58
3.3. Методы, использованные при выполнении работы.....	59
3.3.1. Классические вирусологические методы	59
3.3.2. Методы, использованные для изучения распределения AgNPs в организме мышей.....	62
3.3.3. Экспериментальные и биокомпьютерные методы исследования нуклеиновых кислот	63
3.3.4. Определение относительного содержания иммунореактивных полипептидов методом иммуноблотинга	65
3.3.5. Выделение субклеточных фракций.....	65
3.3.6. Определение каталитической активности ферментов	66
3.3.7. Получение электрофоретически чистых препаратов ЦП	67
3.3.8. Выделение лейкоцитарной фракции.....	68
3.3.9. Исследование апоптоза нейтрофилов	69
3.3.10. Измерение концентрации IL-6 и IL-2.....	69
3.3.11. Измерение бактериальной нагрузки в легких мышей.....	70
3.3.12. Определение концентрации белка.....	70
3.3.13. Окрашивали ПААГ на общий белок.....	71
3.3.14. Измерение концентрации Cu и Ag	71
3.3.15. Статистическая обработка.....	71
4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	72
4.1 Поиск модельного штамма ВГА для заражения мышей	72
4.1.1 Изучение основных свойств кандидатных штаммов	72
4.1.2. Сравнение штамма SA с модельным штаммом PR8	81
4.2. <i>In vivo</i> влияние AgNPs на репродукцию вируса SA.....	85
4.2.1 Физико-химические характеристики наночастиц.....	86
4.2.2. Динамика распределения серебра наночастиц в организме мышей	88

4.2.3. Сравнение действия AgNPs на экспрессию генов метаболизма меди в печени и легких	94
4.2.4. Влияние AgNPs на патогенность вируса SA.....	98
4.2.5. Влияние гриппозной инфекции на показатели статуса меди у мышей, получавших AgNPs.....	99
4.2.6. Влияние AgNPs на уровень экспрессии генов метаболизма меди в легких мышей, зараженных вирусом SA.....	101
4.2.7. Влияние AgNPs на экспрессию некоторых генов на уровне трансляции и формировании зрелых белков в легких мышей, зараженных вирусом SA	102
4.2.8. Анализ возможных механизмов влияния AgNPs на гриппозную инфекцию	106
4.2.9. Оценка перспективы использовать AgNPs в качестве противовирусного препарата непрямого действия.....	111
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	114
6. ВЫВОДЫ	118
7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	119
8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	121
9. Приложение.....	143

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 [42]. 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 [21]. 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 [13]. 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: (1) они должны быть критичными для репродукции вируса и/или подавлять развитие инфекционного процесса; (2) вмешательство в работу этой системы не должно быть критичным для здоровья хозяина.

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 [140]. 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 [140]. Репродукция вируса гриппа А (ВГА) связана с гомеодинамикой меди [214]. Так, блокирование импорта меди в клетки и/или поступление ее в люмен аппарата Гольджи нарушает созревание ВГ [14]. 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 [124]. 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 [112].

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 [150]. Высоко воспроизводимое, стабильное и легко обратимое снижение ПСМ *in vivo* достигается обработкой животных наночастицами серебра (AgNPs) [48, 158, 198]. 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 [28, 214]. Молекула Ag-ЦП содержит менее 4 атомов меди и не обладает оксидазной активностью [32]. Снижение ПСМ практически до нуля 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 [56, 122, 170]. 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 [195]. Изучение влияния AgNPs на протекание вирусной инфекции *in vivo* ограничивается двумя исследованиями: работой Xiang и соавт. [121], в которой авторы продемонстрировали, что интраназальные обработки AgNPs подавляют смертность мышей, зараженных ВГ, практически до нуля, а также исследование Martín-Faivre и соавт., показавшее, что AgNPs усиливают способность альвеолярных макрофагов стимулировать как миграцию NK-клеток, так и выработку IFN- γ [178]. Исследований, направленных на изучение *in vivo* протекания вирусной инфекции на фоне низких ПСМ, неизбежно следующих после обработки AgNPs, 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 неадаптированных к лабораторным мышам современные штаммы вируса гриппа А (H1N1)pdm09 и сравнить их дозо- и время-зависимую способность вызывать острый отек легких и вирусную пневмонию со штаммами, адаптированными к лабораторным мышам.
2. Изучить динамику поступления в легкие мышей серебра AgNPs и оценить характер протекания вирусной инфекции у мышей, предварительно получивших AgNPs.
3. 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.

4. Изучить способность Ag-ЦП индуцировать апоптоз нейтрофилов

5. Оценить перспективу использования AgNPs в качестве противовирусного препарата непрямого действия.

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 получавших AgNPs, снижалась до 30%, по сравнению со 100% летальностью мышей, не получавших 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, получавших AgNPs. Показано, что в легких заражение ВГА вызывает не менее чем 2-кратное повышение активности генов, контролирующих в клетке поступление, распределение и выведение меди (*CTR1*, *ATOX1* и *ATP7A*). Повышается уровень мРНК, программирующей синтез секреторной формы ЦП. Напротив, активность генов медь-зависимой антиоксидантной защиты (*СОД1* и *CCS*) 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, получавших одновременно с заражением ВГА AgNPs, уровень содержания белка СОД1 и ее 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 отсутствии 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 и методы исследования. Задачи для достижения поставленной цели достигались с помощью комплексного подхода 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. В список использованных методов входят методы молекулярной и клеточной биологии: определение первичной структуры вирусного генома, количественная ПЦР, иммуноблотинг, выделение клеток крови, изолирование субклеточных фракций, оценка апоптоза и др. А 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 выделенных белков и нуклеиновых кислот, атомно-абсорбционная спектроскопия. Широко использованы методы молекулярной эволюции, статистики и биокомпьютерного анализа. Для характеристики AgNPs использованы сканирующая и трансмиссионная электронная микроскопия, лазерная дифрактометрия UV/vis-сканирование. Помимо этого, применены такие экспериментальные подходы, как эксперименты типа пульс-чейз и разработка схем эффективного действия AgNPs на статус меди в сыворотке крови мышей, зараженных ВГА.

Положения, выносимые на защиту:

1. Описан новый модельный штамм вируса гриппа современной антигенной структуры A/South Africa/3626/2013 (H1N1)pdm09 (SA), который обладает тремя уникальными штамм-специфическими заменами в генах, кодирующих белки полимеразного комплекса.

2. Донором меди/серебра для клеток легкого является ЦП, и в отличие от клеток печени введение AgNPs вызывает повышение активности генов метаболизма меди.

3. Продолжительность жизни мышей, зараженных ВГА, увеличивается на фоне снижения показателей статуса меди, вызванного предварительным внутрибрюшинным введением AgNPs. Механизм этого увеличения не является прямым воздействием AgNPs ни на репликацию вируса, ни на микрофлору дыхательных путей мышей.

4. Механизмом защиты AgNPs от гриппозной инфекции является противодействие действию вируса на активности генов, кодирующих белки внутриклеточного транспорта меди и белки, связывающие внеклеточную медь.

5. Ag-ЦП теряет способность индуцировать апоптоз нейтрофилов.

6. AgNPs можно рекомендовать в качестве противовирусных препаратов.

Достоверность представляемых результатов и их апробация

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

Результаты были доложены в форме устных и стендовых сообщений на:

IV Всероссийская научная конференция молодых ученых “Медико-Биологические Аспекты Химической Безопасности” (Санкт-Петербург, 2020 г.), III инновационный петербургский медицинский форум, (Санкт-Петербург, 2020 г.), Труды 63-й Всероссийской научной конференции МФТИ, (Москва 2020 г.), Наука СПбГУ– 2020, (Санкт-Петербург, 2020 г.) LifeSciencePolytech, (Санкт-Петербург 2021 г.), 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 г.), 25-ая Международная школа-конференция молодых ученых «Биология-наука XXI века» (Пушино 2022 г.) XXV Кашкинские Чтения, (июнь 2022 г.), X Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов (Новосибирск, 2023 г.), Международный Конгресс "VIII Съезд

Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 300-летию российской науки и высшей школы". (Саратов **2024** г.), Correr 2024 (Неаполь, Италия **2024** г.), IX Всероссийская научная конференция «Клинические и теоретические аспекты Современной медицины» (Москва, **2024**).

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. Определил связь между статусом меди и энзиматической активностью внутриклеточных и внеклеточных купроэнзимов у мышей, зараженных ВГА и обработанных AgNPs. При написании диссертации автор лично осуществил сбор и анализ литературы, выполнил статистическую обработку полученных результатов, проанализировал полученные данные, интерпретацию их и сформулировал выводы.

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

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В этой части диссертации будут рассмотрены современные концепции, рассматривающие: стратегию репликации ВГА, механизмы, обеспечивающие гомеостаз меди у млекопитающих, связь между метаболизмом меди, размножением ВГА и течением гриппозной инфекции, а также способы изменения показателей статуса меди.

2.1. РЕПЛИКАЦИЯ ВИРУСА ГРИППА А

Данные о морфологии ВГА, экспрессии его генома, структуре и функции вирусных белков, факторах заражения и факторах, ограничивающих заражение, реализации стратегии генома вируса от связывания с клеткой до упаковки генома и высвобождения новых вирионов, а также влияния вируса на клетки-мишени и весь организм рассмотрен в современных аналитических обзорах, опубликованных в высокорейтинговых журналах [168, 181, 205]. Здесь будут рассмотрены только основные детали цикла репликации ВГА с уделением внимания их связи с клеточным метаболизмом меди..

2.1.1. Морфология ВГА

ВГА принадлежит семейству Orthomyxoviridae, члены которого имеют оболочку. Для вирионов лабораторно-адаптированных штаммов ВГА и вирионов ВГА, пассированного в куриных эмбрионах, характерна эллипсоидная форма, примерно 100x100 нм. Вирионы клинических изолятов ВГА имеют нитевидную форму 80x250 нм (Рис. 1). Наружный слой вирусной оболочки представляет собой мембрану, состоящую из липидного бислоя клетки-хозяина и трех интегральных трансмембранных белков ВГА. На поверхности мембраны экспонируются гидрофильные домены двух вирусных N-гликопротеинов: гемагглютинирина (НА) и нейраминидазы (НА). НА координирует распознавание клетки хозяина, прикрепление, а также отвечает за слияние мембран вируса и клетки-мишени и высвобождение вирусного генома в цитозоль (Рис. 1). НА необходима для отделения новообразованных вирионов от клетки-хозяина. На электронно-микроскопических изображениях НА и НА выглядят как шипы или выступы на

поверхности вируса. Третий трансмембранный белок вирусной оболочки, M2, представляет собой гомотетрамер, который обладает активностью протон-селективного ионного канала, участвующего как в проникновении вируса, так и в образовании новых вирусов во время сборки и почкования вируса. HA и NA присутствуют в оболочке в среднем соотношении 4:1, тогда как белок M2 встречается в меньшем количестве (одна молекула M2 на десятки молекул HA).

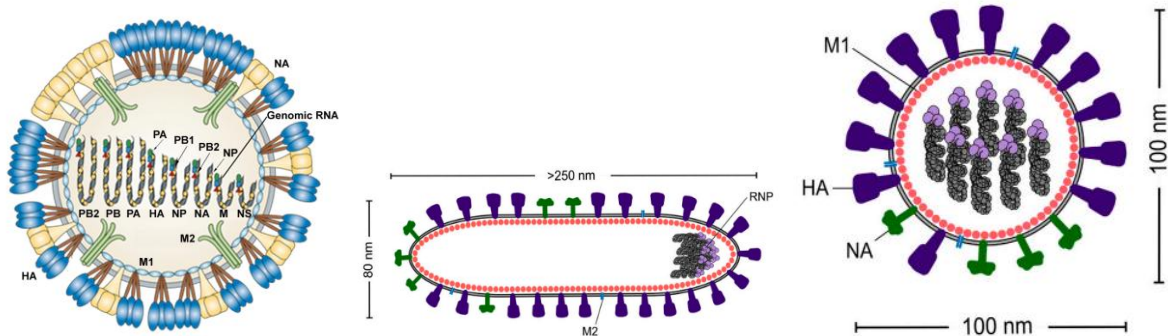


Рисунок 1. Схематическое строение ВГА. Обозначения: NA – нейраминидаза; HA – гемагглютинин; M2 – протонный насос; M1 – матриксный белок; NP – нуклеопротеин; NS – неструктурный нуклеопротеин, также называемый NEP – белок ядерного экспорта; PA, PB, PB1 и PB2 – РНК-полимеразные субъединицы; RNP – рибонуклеопротеид [181].

Внутренний слой вирусной оболочки представляет собой каркас из матриксного белка M1. Он поддерживает липидный бислой изнутри, обеспечивая трехмерную структуру вириона и механическую жесткость, а также окружает ядро вириона своей внутренней стороной. На внешней поверхности матрикса белок M1 образует контакты с С-концевыми доменами HA и NA, а на внутренней поверхности взаимодействует с коровыми белками вириона.

Геном ВГА состоит из восьми фрагментов одноцепочечных антисмысловых РНК (vRNA), которые кодируют 10 основных вирусных белков и несколько штамм-зависимых дополнительных белков (Рис. 2) [168, 204, 240].

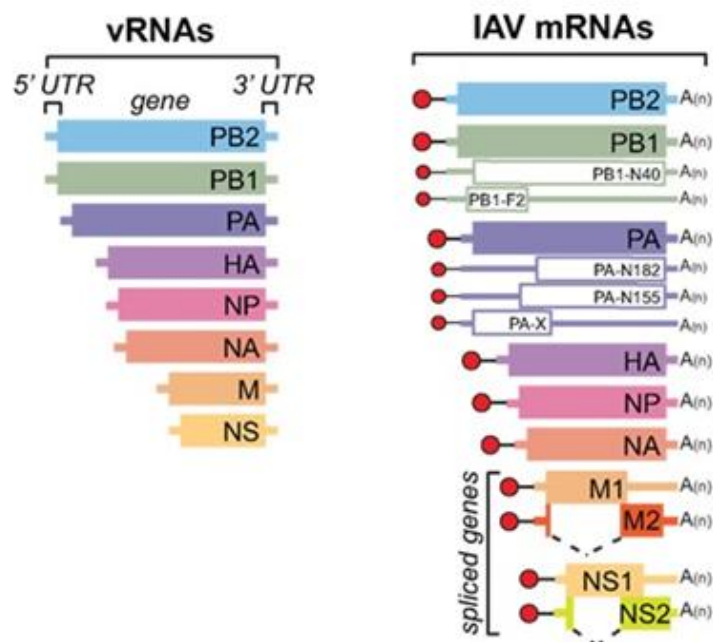


Рисунок 2. Схема организации генома ВГА. Слева: восемь генных сегментов вирусной РНК (vRNAs), которые содержат 5'- и 3'-нетранслируемые области (UTR), включающие вирусные промоторы и последовательности, участвующие в упаковке вириона (указаны квадратными скобками). представленная линия, Кодированная область, показана прямоугольником. Справа: вирусные мРНК, которые транскрибируются с vRNAs. Пунктирные линии показывают альтернативный сплайсинг транскриптов вируса гриппа А для М и NS. Красные кружки представляют 5'-кэп (м⁷Gp) и черные линии обозначают 10–13 нуклеотидные праймеры клетки-хозяина, которые получают с помощью механизма захвата кэпа вирусной полимеразой. A(n) соответствует 3'-поли-А-хвосту, образующемуся в результате проскальзывания вирусной полимеразы. mRNA меньшего размера (пустые прямоугольники) представляют собой транскрипты, кодирующие несущественные дополнительные белки, обнаруженные во многих штаммах [240].

5'- и 3'-концы каждой vRNA самокомплементарны, благодаря этому формируется шпилька с длинной ножкой, которая в дальнейшем сворачивается за счет внутримолекулярных взаимодействий в компактную вторичную структуру vRNA. Каждая vRNA связана с набором белков, образующих рибонуклеопротеин (vRNP). 5':3'-концы vRNA связаны с гетеротримерным комплексом РНК-зависимой РНК-полимеразы, содержащим 3 субъединицы – PA, PB1 и PB2 (обозначения обусловлены химическими свойствами белков: кислотный, основной 1 и основной 2, соответственно). Копии богатого аргинином нуклеопротеина (NP) связаны с двухцепочечной областью стебля vRNA. И NP, и комплекс РНК-зависимой РНК-полимеразы содержат как сигналы ядерной локализации, так и сигналы ядерного экспорта. Белок NEP, называемый неструктурным белком 2, NS2, также содержит сигналы для ядерного импорта и экспорта [162, 205]. vRNAs имеют

высоко консервативные некодирующие области как на 3'-, так и на 5'-концах, которые используются в качестве *цис*-элементов для регуляции репликации и транскрипции вирусным полимеразным комплексом. Они также принимают участие в упаковке во время сборки вируса. Вирион также содержит белок NS1, который первоначально называли неструктурным (NS1 – неструктурный белок 1). Этот белок обладает множеством функций, обеспечивая взаимодействие между вирусом и хозяином, способствуя репликации вируса подавляя врожденную иммунную систему [205]. Помимо вирусных белков, вирион обычно содержит несколько белков хозяина в незначительных количествах (CD9, CD81, аннексины, компоненты цитоскелета, и другие). Роль специфических белков хозяина в жизненном цикле ВГА дискутируется. Вирус содержит 40–50 незакрепленных полиубиквитиновых цепей со свободными С-концами, которые рекрутируются во время сборки вириона и используются для высвобождения vRNPs в следующем инфекционном цикле [180].

2.1.2. Репродукция ВГА

Жизненный цикл вируса начинается, когда молекулы НА вирусной оболочки связываются с их рецептором на клетке-мишени. Он включает следующие стадии: 1) узнавание/проникновение в клетки, 2) производство РНК и белка, 3) сборка вириона и выход из клетки-хозяина. Основными клеточными компартментами-хозяина клетки, участвующими в размножении вируса, являются эндосомальный компартмент, цитозоль, ядро, эндоплазматический ретикулум (ЭР) и комплекс Гольджи (Рис. 3).

1 этап. Проникновение в клетку начинается с распознавания потенциального хозяина и прикрепления вириона к клеточной мембране. На поверхности клетки-хозяина вирусная НА узнает концевые остатки N-ацетилнейраминовой кислоты (NANA) — углеводного фрагмента N-гликопротеинов, принадлежащих рецепторам эндоцитозного типа. НА распознает остатки NANA, связанные с галактозой через углерод-3 или углерод-6 (α -2,6- или α -2,3-связи). У человека α -2,6-связи преобладают в эпителиальных клетках трахеи, тогда как α -2,3-связи чаще

встречаются в респираторном эпителии [114]. Прикрепление вириона к рецептору инициирует клатрин-опосредованный эндоцитоз, и вирус попадает в эндосомальный компартмент. Описаны и другие пути проникновения в клетку ВГА, включая кавеолин-опосредованный эндоцитоз и макропиноцитоз, однако, детали этих процессов менее ясны [139]. В эндоцитозных везикулах, содержащих вирус, концентрация протонов увеличивается за счет действия H^+ -АТФазы. Благодаря активности белка M2 — протон-селективного ионного канала — протоны активно проникают в вирусный кор. При снижении значения pH происходит конформационное изменение белка M1, что приводит к нарушению его контактов с НА, vRNPs, а также контактов между собственными копиями. В результате белки матрикса отделяются от белков, покрывающих геном РНК, и начинается процесс снятия покрытия. Кроме этого, низкий pH вызывает конформационное изменение молекулы НА, способствуя ее расщеплению трипсиноподобной протеазой хозяина на две субъединицы: НА1 и НА2. Субъединицы НА2 претерпевают переход, ведущий к спиральной структуре из 3 альфа-спиралей, которые играют решающую роль в нацеливании и прямом слиянии мембраны вирусной частицы с эндосомальной мембраной. Все эти события приводят к выходу vRNPs в цитозоль через пору, образовавшуюся в результате слияния вирусной оболочки с мембраной эндосомы. Незакрепленные полиубиквитиновые цепи распознаются цитозольной гистондеацетилазой 6 — ключевым фактором сборки микротрубочек-зависимых или микрофиламентных моторных комплексов. Эти комплексы обеспечивают тянущую силу, которая облегчает высвобождение vRNPs в цитозоль [236, 240].

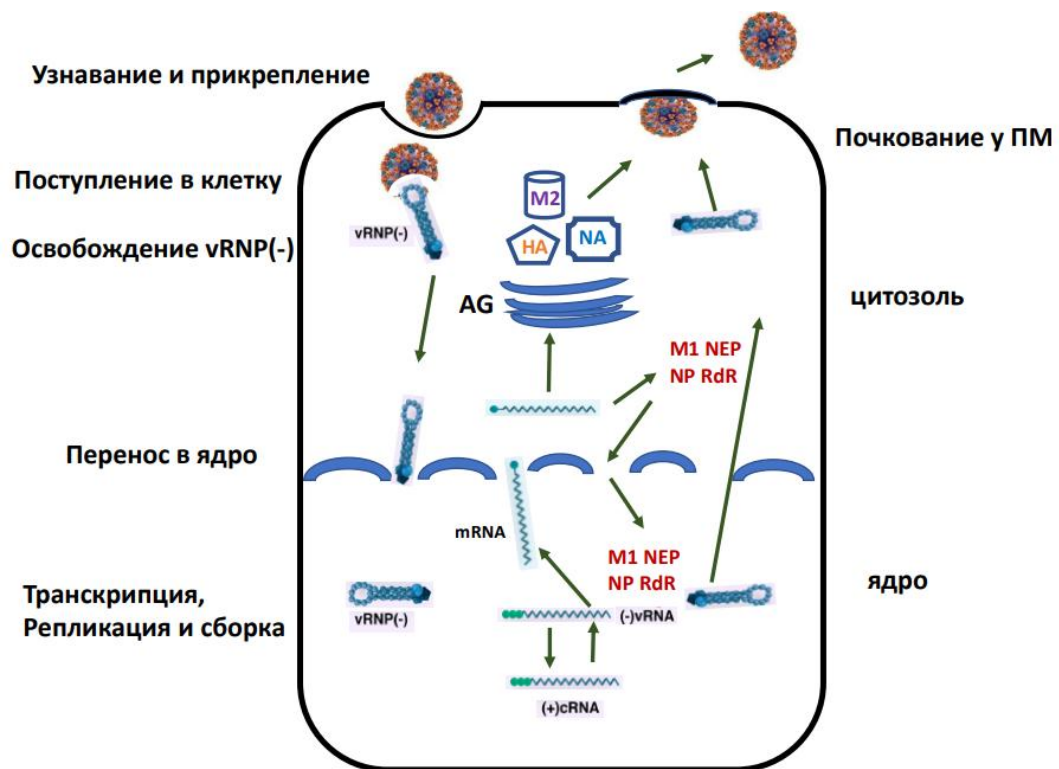


Рисунок 3. Схематическое изображение важных этапов жизненного цикла ВГА. Слева: этапы цикла репродукции ВГА; справа: внутриклеточная локализация этих этапов. Модифицировано из [214].

2 этап. Производство РНК и белка начинается после транспорта v-RNPs в ядро. Доставка обеспечивается малым кариоферином $\beta 2$, ГТФазой и наличием сигналов ядерной локализации в РНК-полимеразе и белке NP. Связывание кариоферина $\beta 2$ с vRNPs вызывает их полную диссоциацию от белков M1. В ядре антисмысловая v-RNAs используется вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразой в качестве матрицы для синтеза двух типов РНК: для транскрипции (mRNAs) и для репликации (-vRNAs) [88]. Для повышения информационной емкости ВГА использует альтернативный сплайсинг [240]. Так, из одного сегмента v-RNA может быть образовано несколько различных v-mРНК. Транскрибируемые v-mRNAs содержат кэп и поли(А)-тракт, которые необходимы для экспорта в цитозоль и распознавания эукариотическими факторами трансляции. Предшественники v-mRNAs получают кэпы по механизму «cap snatching» (белки PB1 и PB2 «крадут» короткие 5'-кэпированные транскрипты, продуцируемые клеточной РНК-полимеразой II, которые затем используются для первичной транскрипции v-mRNAs) [92]. Поли(А)-тракт v-mRNAs кодируется геномными vRNAs в виде

участка из 5–7 остатков урацила, которая не используется для экспорта из ядра [238]. Зрелые v-mRNAs переносятся из ядра в цитозоль системой экспорта мРНК хозяина: они связываются с кэп-связывающим белком, поли(А)-связывающим белком и другими ядерными белками, которые облегчают экспорт v-mRNAs в цитозоль. Здесь v-mRNAs транслируются рибосомами хозяина. Вирус использует несколько стратегий увеличения разнообразия протеома за счет альтернативной трансляции v-mRNAs: наличие нескольких альтернативных стартовых кодонов, сдвигов рамки считывания, альтернативных открытых рамок считывания и т.д. Вирусные мРНК, кодирующие три белка внешнего слоя вирусной оболочки (НА, NA и М2) также кодируют N-концевые сигнальные пептиды, обеспечивающие связывание nascentных (новосинтезированных) пептидов с мембранами шероховатого ретикулума и их поступление в просвет секреторного пути. Здесь внеклеточные домены НА и NA ко-трансляционно N-гликозилируются, затем белки переносятся в аппарат Гольджи, где завершается созревание углеводных фрагментов, и, наконец, они доставляются на плазматическую мембрану. Остальные вирусные белки синтезируются на свободных полирибосомах в цитозоле. Растворимые белки цитозоля содержат сигналы, которые направляют их в ядро для сборки вириона. Каждая реплицированная геномная vRNA принимает структуру шпильки и связывает комплекс РНК-полимеразы на своем 3':5' двухцепочечном стебле, тогда как белки NP связываются с РНК по всей ее длине [88]. Таким образом, vRNAs, РНК-полимераза и NP образуют восемь -vRNPs.

3 этап. Сборка вириона и выход из клетки-хозяина. ГТФ-зависимые импортины отвечают за доставку v-RNPs в цитозоль через ядерный поровый комплекс. Попавшие в цитозоль v-RNPs связываются с рециклизирующими эндосомами. Там каждый v-RNP связывает цитозольный М1, в результате комплексы v-RNP/М1 начинают ассоциироваться. v-RNPs имеют специфические сигналы упаковки в 3'- и 5'-областях и вдоль двухцепочечной области, которые могут связывать соседние v-RNPs посредством спаривания Уотсона-Крика (комплекс целующейся петли), образуя геномное ядро вириона [238]. Последовательность сборки комплексов -vRNPs может варьировать. Наиболее

экспериментально подтвержденная схема сборки ВГА — (7+1): семь -vRNPs собираются латерально, их 3'- и 5'-концы располагаются в одинаковой ориентации с восьмым -vRNP посередине [240]. Транспортные везикулы, отпочковавшиеся от аппарата Гольджи, переносят белки НА, NA и М2 в апикальный домен клеточной мембраны. Их слияние с мембраной происходит в рафтообразных участках, обогащенных сфинголипидами и холестерином [240]. Событие связывания между белком М1 и С-концевыми доменами НА, NA и М2 стимулирует кластеризацию, сборку оболочки белка ВГА и начало почкования вируса на плазматической мембране. Упакованные и собранные -vRNPs доставляются к месту отпочкования плазматической мембраны посредством транспорта, зависящего от микротрубочек. Накопление НА и NA в липидных рафтах стимулирует рост и самозамыкание почкующихся везикул. Это приводит к высвобождению потомства вируса из клетки. В процессе активно участвует вирусная NA, отщепляющая сиаловую кислоту от гликопротеинов и гликолипидов клеточной поверхности.

2.1.3. Заражение мышей вирусом гриппа

Для исследования различных аспектов патогенеза гриппа у млекопитающих было использовано множество животных моделей, включая мышей, хлопковых крыс, сирийских хомяков, морских свинок, хорьков, собак, кошек, домашних свиней и приматов, таких как макаки и мартышки [6, 31].

Мыши обладают многими преимуществами в качестве модели для исследования вируса гриппа, включая их относительно низкую стоимость, доступность и простоту содержания. Многие инбредные линии и аутбредные популяции мышей имеются в продаже, и их восприимчивость к заражению вирусом гриппа варьирует в зависимости от их генетического происхождения. Кроме того, существование многочисленных трансгенных, нокаутных линий инбредных мышей позволяют изучать специфические иммунные эффекторы в контексте гриппозной инфекции [19, 31]. Основное преимущество мышинной модели заключается в том, что можно использовать большое количество животных, что позволяет легко получать статистически достоверные данные. По этой причине первоначальные

исследования безопасности и эффективности противовирусных препаратов, одобренных в настоящее время для применения против вирусов гриппа, были проведены *in vivo* на мышинной модели. Основным недостатком мышинной модели является необходимость использования адаптированных к мышам вирусов для достижения клинически выраженных признаков заболевания вплоть до летальных исходов [31]. Кроме того, гриппозная инфекция у мышей в основном поражает нижние дыхательные пути, что физиологически отличается от типичного гриппа у людей, который как правило поражает верхние дыхательные пути [19, 31].

2.1.3.1. Восприимчивость мышей к вирусам гриппа человека

Как правило, вирусы гриппа человека прикрепляются к мембраносвязанным протеогликанам, содержащим остатки сиаловой кислоты, имеющим $\alpha 2,6$ -галактозную связь. Такие рецепторы широко представлены в верхних дыхательных путях человека [114]. Однако в дыхательных путях мышей преобладают сиаловые кислоты со связью $\alpha 2,3$, а количество связанных с $\alpha 2,6$ сиаловых кислот мало [17]. Это может объяснять, почему вирусные изоляты человека плохо размножаются у мышей без предварительной адаптации, поэтому первичные человеческие изоляты должны быть последовательно пассированы через мышей [27, 31].

В мышинной модели часто используется несколько адаптированных к мышам штаммов вируса, включая два изолята гриппа A/H1N1, выделенных в 1930-х годах, и вирус гриппа B, выделенный в 1940 году: A/Puerto Rico/8/1934 (PR8), A/WSN/1933 (WSN) и B/Lee/1940, соответственно. Исследования, в которых требуется вирус подтипа гриппа A/H3N2, часто проводят с использованием адаптированных штаммов A/Victoria/35/72 (H3N2) и A/Aichi/2/68 (H3N2) или с использованием реассортантного вируса X-31, геном которого содержит гены HA и NA вируса A/H3N2 и шесть внутренних генов из штамма PR8 [19, 31].

Адаптация штамма PR8 потребовала 158 пассажей на мышях [175]. В 1940 году количество пассажей вируса на легких мышей уже достигло 333 [212]. Кроме того, было зарегистрировано более 100 пассажей на хорьках и 200 - в куриных эмбрионах [144]. Как следует из другого источника, процесс адаптации PR8 включал

77 пассажей на мышах, 717 - в культуре клеток, 30 - в куриных эмбрионах, 5 - на хорьках и, наконец, еще 50 в куриных эмбрионах [109].

Вирус WSN был адаптирован путем многократного пассирования через мозг мышей, в результате чего был получен штамм, который у мышей является нейротропным и высоковирулентным [30].

Эти устаревшие вирусы, адаптированные для мышей, генетически или антигенно не являются репрезентативными для вирусов гриппа, циркулирующих в настоящее время среди людей. С другой стороны, некоторые вирусы гриппа вызывают заболевание у мышей без предварительной адаптации. К ним относятся пандемический штамм H1N1 1918 года [76], высокопатогенные вирусы птичьего гриппа подтипа H5N1[1], некоторые вирусы подтипа H7 [98], подмножество низкопатогенных вирусов птичьего гриппа [57] и пандемические штаммы гриппа H1N1 2009 года [166].

2.1.3.2. Генетические факторы мышей, влияющие на их восприимчивость к гриппу

Восприимчивость мышей к вирусам гриппа зависит не только от штамма вируса гриппа, но и от линии мышей, которые заметно отличаются по своей устойчивости к гриппозной инфекции. Большинство лабораторных мышей гораздо более восприимчивы к вирусной инфекции гриппа, чем дикие мыши [19, 134]. Было показано, что основой для этого различия является то, что лабораторные линии несут большую делецию в гене устойчивости к миксовирусу 1 (MX1) [19], гене, индуцируемом интерфероном (IFN), который обеспечивает защиту от многих вирусов [107]. К тому же линии мышей, у которых отсутствует (MX1), обладают очень разной чувствительностью, при этом мыши A/J более восприимчивы, чем широко используемые штаммы C57BL/6 и BALB/c, а мыши DBA еще более восприимчивы [15, 227]. Важно отметить, что скрещивания резистентных и восприимчивых линий мышей демонстрируют градиент резистентности [4, 12, 23]. Это позволяет предположить, что восприимчивость мышей к вирусу связана с более чем одним геном [19].

Еще одним фактором, влияющим на тяжесть течения гриппа у мышей, является воспалительная реакция, вызываемая вирусом. Было показано, что тяжесть гриппозной инфекции возрастает при усилении воспалительной реакции [2, 36]. После заражения мышей гриппом происходит активация генов воспаления, особенно после заражения высокопатогенными вирусами [16]. У разных линий мышей гены воспаления регулируются по-разному. Восприимчивые к инфекции мыши проявляют более сильную воспалительную реакцию [227]. Однако генетическая природа данной связи пока не выявлена.

2.1.3.3. Патогенез гриппа у мышей

В отличие от людей, мыши, инфицированные вирусом гриппа, не проявляют чихания, кашля или выраженной лихорадки, но манифестируют выраженную анорексию и демонстрируют поведение, соответствующее физическому дискомфорту или вялости, например, съеживаются, сутулятся, шерсть становится дыбом из-за отсутствия самоухода и обезвоживания. У мышей развивается гипотермия, а не лихорадочная реакция [6, 31]. Особенностью репликации вируса у мышей является то, что повреждение тканей в основном локализуется в нижних дыхательных путях. Клинически это проявляется затрудненным дыханием и цианозом, а посмертно - тяжелой легочной гистопатологией. Вскрытие мышей с тяжелым течением гриппа выявило поражения легких, характерные для пневмонии, включая отек легких и воспалительные инфильтраты [31, 166]. Кроме того, многие высокопатогенные вирусы птичьего гриппа подтипов H5 и H7 распространяются за пределы дыхательных путей мышей в другие ткани, включая головной мозг, селезенку, тимус, почки, печень и сердце [5, 98]. Это системное распространение происходит из-за наличия многоосновного участка расщепления в НА (кливедж-сайта), что приводит к развитию таких дополнительных признаков заболевания, как паралич задних конечностей и легкий энцефалит [156].

Наиболее часто используемыми параметрами для оценки патогенности вируса гриппа у мышей являются потеря массы тела и смертность в зависимости от дозы заражения. Титры вируса в легких также часто используются в качестве

показателя репликации вируса, особенно при оценке иммунитета или про противовирусной терапии [19, 31]

Тяжесть протекания вирусной инфекции зависит и от способа инокуляции вируса, например, летальная доза (LD_{50}) адаптированного к мышам реассортанта X-31 у мышей BALB/c была более чем в 10 раз выше, когда вирус вводили интраназально, а не аэрозолем. Аналогичные результаты были получены в случае с вирусом PR8, где летальная доза для мышей BALB/c при интраназальном введении была примерно в 6 раз выше, чем при обработке аэрозолем [3, 31, 239].

2.2. БИОЛОГИЯ МЕДИ

2.2.1. Химические свойства меди, определяющие ее биоактивность

Медь занимает номер 29 четвертого периода I группы подгруппы 2 и по структуре электронной оболочки относится к d -элементам $[Ar]3d^{10}4s^1$, то есть медь является переходным элементом. Благодаря этому медь существует в нескольких состояниях окисления, два из которых стабильны: Cu(I), купро-ион с электронной конфигурацией $3d^{10}$ и Cu(II), куприк-ион, имеет электронную конфигурацию $3d^9$, в которых она образует многочисленные комплексные соединения с лигандами, содержащим аминную, гидроксильную, имидазольную, карбоксильную, нитрильную и тиольную группы [249]. Cu(I) образует устойчивые комплексы при координационном числе 2, комплексы Cu (II) имеют координационные числа 4, 5, 6.

2.2.2. Роль купроэнзимов в метаболизме млекопитающих

В купроэнзимах, в зависимости от природы и расположения лигандов, медь имеет широкий интервал окислительно-восстановительных потенциалов. Купроэнзимы катализируют разнообразные окислительно-восстановительные реакции с переносом электронов при переходах меди $Cu(I) \leftrightarrow Cu(II)$, выступая как в роли донора, так и акцептора. Ионы меди остаются прочно связанными лигандами координационных сфер и не обмениваются [182]. Это обеспечивает безопасное протекание окислительно-восстановительных реакций. В апо-купроэнзимы атомы

меди включаются пост-трансляционно и в строго определенной последовательности, если их больше одного [53] (Chaplin et al., 2017).

Медьсодержащие активные центры найдены в оксигеназах, гидролазах, оксидоредуктазах, электрон-трансферазах. Два внутриклеточных купроэнзима, цитохром-с-оксидаза (ЦЦО) и СОД1, присутствуют практически во всех клетках аэробных организмов поэтому могут считаться убиквитическими. Первый из них – митохондриальная **ЦЦО**, терминальный дыхательный комплекс цепи переноса электронов [94]. Это 13-субъединичный гетеромерный белковый ансамбль с общей молекулярной массой около 300 кДа. В его каталитический центр входят 2 медных центра: бинуклеарный центр CuA, который принимает электроны от цитохрома C, и центр CuB с единственным атомом меди, связанным с гемом *a₃*, передающим электроны на кислород с образованием воды.

Cu/Zn-СОД представлены цитозольной (СОД1) и внеклеточной (СОД3) формами [105]. Обе формы катализируют диспропорционирование $\bullet\text{O}_2^-$ в молекулярный кислород и перекись водорода, таким образом, обезвреживая высокотоксичные супероксидные радикалы на первом этапе образования активных форм кислорода (АФК). **СОД1** существует как гомодимер, каждый мономер имеет молекулярную массу 16 кДа, содержит метал-связывающую петлю, координирующую Cu^{2+} и Zn^{2+} , образующих активный центр фермента, в котором Zn^{2+} способствует общей стабильности белка. Полное созревание фермента завершается образованием стабилизирующей дисульфидной связи после встраивания Cu^{2+} . Для встраивания меди в активный центр СОД1 [85].

СОД3 обнаружена в кровеносных сосудах, легких, почках, матке и, в меньшей степени, в сердце [105]. Фермент экспрессируется в различных органах, включая сосуды, сердце, мозг, легкие, почки и плаценту, она защищает от окислительного стресса соответствующие внеклеточные пространства. СОД3 – гомотетрамер с молекулярной массой 135 кДа, состоит из 4 идентичных субъединиц. Каталитические центры мономеров СОД1 и СОД3 почти идентичны. В отличие от СОД1, СОД3 является пре-про-белком, она имеет ко-трансляционно отщепляемый сигнальный пептид и добавляемый ко-трансляционно N-гликан.

Отщепление про-последовательности необходимо для индукции ферментативной активности СОД3. На С-конце расположен домен, обогащенный остатками основных аминокислот, участвующий в связывании с компонентами внеклеточного матрикса – гепарин/гепарансульфатом и коллагеном I типа. Этот домен подвергается регулируемому расщеплению, который позволяет освободить СОД3. Таким образом, СОД1 и СОД3, являясь центральными звеньями антиоксидантной защиты, регулируют уровень супероксидных анионов в клетке и во внеклеточном пространстве, что позволяет им играть критическую роль в метаболизме клеток и органов.

Два купроэнзима, **пептидилглицин- α -амидирующая монооксигеназа (РАМ)** и **дофамин- β -гидроксилаза (DBH)** экспрессируются преимущественно в мозге. **РАМ** участвует в пост-трансляционном созревании более чем половины нейропептидов [67]. Она содержит два активных центра, которые осуществляют созревание нейропептидов в 2 этапа. На первом РАМ катализирует альфа-гидроксилирование, а на втором – она расщепляет промежуточный пептидил-альфа-гидроксиглицин, амидируя предпоследнюю аминокислоту и образуя глиоксилат. Реакция требует присутствия двух атомов меди в каталитическом центре и аскорбата. Фермент существует в секреторной и мембраносвязанной форме, синтез которых программируют две сплайс-изоформы мРНК, не содержащей, или содержащей, экзон, кодирующий трансмембранный домен. Мембранная форма РАМ в транс-сети Гольджи функционирует в составе прогормон конвертазы [202]. В секреторных везикулах обнаружена растворимая форма РАМ [58]. Помимо этого, протеолитическое расщепление трансмембранного домена РАМ приводит к высвобождению растворимого фрагмента и транспорта его в ядро. Существование во множественных формах помимо каталитической функции, позволяет РАМ играть ключевую роль в изменении функции клеток, в частности в реорганизации цитоскелета, секреции гормонов, изменение активности генов и др. [68, 193].

Подобно РАМ, **DBH** для каталитической активности использует атомы меди, включенные в ее активный центр, в качестве кофактора аскорбат, а также

молекулярный кислород, на который медь передает электроны [126]. Это объясняет сходство каталитических доменов этих двух купроэнзимов [215]. DBH имеет общую молекулярную массу 209 кДа, каждая субъединица которого координирует 2 атома меди. Фермент существует в растворимой и мембраносвязанной формах.

Тирозиназы (монофенолмонооксигеназы) обнаружены у всех организмов [206]. Их основной функцией является синтез из L-DOPA (L-3,4-дигидрофенилаланин) нескольких типов меланинов, высоко молекулярных нерастворимых пигментов с нерегулярной структурой, а также окисление фенолов и катехоламинов в *орто*-хиноны. Меланины участвуют в эффективной защите от УФ-радиации, АФК и радиоактивного облучения. Уровень содержания меланинов и комбинация их типов обуславливают разнообразие окраски животных, растений и грибов.

Протеин-лизин-6-оксидаза (LOX) является лизил тирозилхинон-содержащей медь-зависимой аминоксидазой. Это секреторный фермент эндотелиальных клеток, который катализирует окислительное дезаминирование первичных аминогрупп в реакционноспособные альдегидные группы в коллагене и эластине и таким образом инициирует внутри- и межмолекулярное сшивание с образование межклеточного матрикса [199].

У млекопитающих идентифицированы четыре **ферроксидазы**: две сплайс-формы церулоплазмина (ЦП) – растворимый ЦП и ЦП, связанный с плазматической мембраной через гликозилфосфатидил инозитоловый якорь (ГФИ-ЦП), а также два однопроходных трансмембранных белка – гефестин (HERN) и циклопен (ZP). Эти купроэнзимы в многочисленном семействе мультимедных голубых оксидаз (ММО), принадлежащих различным филогенетическим ветвям, включены в группу «6-доменные ММО» [213]. Структурная организация молекул ЦП, HERN и ZP сходна, их каталитические центры организованы одинаково, а общая идентичность достигает почти 50% [117].

Наиболее детально изучен **ЦП**. Белок состоит из одной полипептидной цепи, у человека, содержащей 1065 аминокислотных остатка [115]. В молекуле ЦП выделяют шесть гомологичных доменов и три типа сайтов, связывающих медь с

различными спектроскопическими свойствами: интенсивно голубая медь (тип I), неголубая, обнаруживаемая электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) (тип II) и неголубая, не обнаруживаемая ЭПР (тип III). Типы I и II являются моонуклеарными, в то время как тип III относится к бинуклеарным центрам. Они координируют шесть атомов меди, из которых три распределены между тремя центрами меди типа I в доменах 2, 4 и 6. Другие три атома типа II/типа III находятся в 3-ядерном кластере на границе доменов 1 и 6. С молекулой ЦП лабильно связаны еще 2–3 некаталитических атома меди [128]. Помимо медных центров, все упомянутые ферроксидазы имеют сайт высоко аффинного связывания ферро-иона, который конвертируется в ферри-ион. При этом электроны переносятся атомами меди прямо на молекулу кислорода с образованием воды [230]. У млекопитающих основная масса ЦП представлена продуцируемым печенью секреторным N-гликопротеидом, содержащим двух- и трех-антенные сialiрированные углеводные части. У человека на долю ЦП приходится более 95% сывороточной меди [74, 115]. Помимо печени, растворимый ЦП производится также клетками лактирующей молочной железы, лимфоцитами [74, 75]. Помимо ферроксидазной, растворимый ЦП демонстрирует еще несколько активностей. Во-первых, он играет ключевую роль в доставке меди к клеткам негепатоцитарных рядов [147]. Во-вторых, ЦП, обладая, хотя и очень низкой, супероксиддисмутазной активностью [248], по-видимому, способен защищать внеклеточное пространство от окислительного стресса. Также он проявляет оксидазную активность в отношении монооксид азота(II) и биогенных ароматических аминов (серотонина, допамина, адреналина, норадреналина), а также абиогенных диаминов, проявляет глутатион-опосредованную пероксидазную активность, и контролирует апоптоз нейтрофилов [63, 101, 225]. Его концентрация в несколько раз повышается при онкологических заболеваниях, по-видимому, в связи с центральной ролью меди в процессе неоваскуляризации [63]. ЦП относят к группе сывороточных белков острой фазы, так как его уровень в крови повышается в течение воспалительных процессов различного происхождения [213]. Почти в 2 раза содержание ЦП в крови

повышается при беременности, что отражает его функцию донора меди для развивающихся эмбрионов [75].

Экспрессия мембранных феррооксидаз носит органоспецифический характер. **ГФИ-ЦП** синтезируется в астроцитах и клетках Сертоли [104, 165], глиальных клетках различных отделов головного мозга [243], лимфоцитах и макрофагах периферической крови и культивируемых гепатоцитах [118], в дифференцирующейся молочной железе [75], белом жире [40], а также в клетках других органов, но не в гепатоцитах. **НЕРН** преимущественно является продуктом клеток тонкого кишечника и мозга. Феррооксидаза **ZP** экспрессируется в плаценте, децидуальной оболочке матки, молочной железе, почках, мозге, семенниках и в других органах [117]. Убедительно показано, что основной биологической функцией ГФИ-ЦП, НЕРН и ZP является участие в мобилизации железа из клеток [117]. Их общим партнером в этом процессе является ферропортин [213]. Исследования на мышах с нокаутом генов показали, что НЕРН и ГФИ-ЦП взаимозаменяемы [72]. Таким образом, феррооксидазы млекопитающих являются ключевыми участниками двунаправленного транспорта железа через клеточные мембраны. Потеря активности любой из них приводит к накоплению железа в клетках органов, где они экспрессируются, что ведет к развитию нейродегенеративных заболеваний, или к глобальному нарушению транспорта железа в печень, что вызывает развитие медь-зависимых анемий.

Недавно было показано, что **селен связывающий белок Р (SBP1)** является медь-зависимой тиол оксидазой. Он катализирует превращение метантиола в перекись водорода, сероводород и формальдегид. Однако известно, что SBP1 играет важную роль в таких фундаментальных физиологических процессах, как деградация белка, внутриклеточный транспорт, клеточная дифференцировка, клеточная подвижность, регуляция эффекта Варбурга. Для всех этих активностей присутствие меди не требуется [188].

Два **фактора свертываемости крови V и VIII** в процессе образования кровяного сгустка в местах нарушения структуры плазматической мембраны стабилизируют и повышают активность эффекторных протеаз. Оба фактора имеют

центры связывания меди по пространственной и первичной структуре гомологичные с ЦП [20], но, возможно, координируемый ими ион меди, выполняет функцию структурного кофактора [35].

2.2.3. Роль меди в регуляции клеточной активности у млекопитающих

Биологическая функция меди не ограничивается ее участием в каталитических центрах купроэнзимов. Первые доказательства её роли в регуляции роста эндотелиальных клеток были получены более 40 лет назад [73]. К настоящему времени накопились многочисленные данные, свидетельствующие о регуляторных функциях меди. Так, внутриклеточные и локальные внеклеточные изменения концентрации меди влияют на активность онкосупрессора p53 [247], транскрипционные факторы NF-κB [61] и HIF1α [79]. Каждый из них регулирует экспрессию нескольких десятков генов, в том числе генов, продукты которых принимают участие в перепрограммировании энергетического обмена в опухолевых клетках, в развитии иммунного ответа и воспалении. К тому же X-сцепленный ингибитор белка апоптоза (XIAP), который является участником нескольких сигнальных путей, для своей активности связывает медь. Это связывание приводит к высвобождению каспазы 3, которая запускает XIAP-опосредованный апоптоз [200]. Медь также участвует в регуляции сигнальных путей, формируемых Ras/MAP и MAPK/ERK киназами [52, 80]. Она модулирует работу рецепторов факторов роста [218], одорантных рецепторов, а также рецепторов γ-аминомасляной кислоты и глутамата [87, 106]. В этих случаях медь выступает в качестве ко-рецептора. К тому же она модулирует активность рецепторов, сопряженных с большими G-белками [191], инициирует индукцию независимой от комплекса Гольджи секреции интерлейкинов и цитокинов [186], контролирует органогенез и дифференцировку в течение эмбрионального развития [231]. Как аллостерический эффектор медь регулирует активность фосфодиэстеразы 3B, стимулируя липолиз в адипоцитах [84].

Особенную группу медь-связывающих регуляторных белков составляют белки, сочетающие медь-зависимую ферментативную и регуляторную активности. К таким белкам относится MEMO1 (mediator of cell motility 1) и пять LOX-

подобных белка (LOXL1-5), входящих в семейство LOX белков (см. выше, раздел 2.2.2). MEMO1, являясь медь-зависимым регулятором FGFR-сигналинга, ответственного за реализацию программы эмбрионального развития, стимулирует клеточную миграцию и инвазию в опухолевых клеток молочной железы [137, 148, 149]. Все представители семейства LOX-подобных белков по каталитическим свойствам сходны с купроэнзимом LOX [229]. В то же время разнообразие молекулярных форм LOX/LOXL, обеспеченное альтернативными пост-транскрипционным и пост-трансляционными модификациями, позволяет им осуществлять специфическое формирование, ремоделирование и регенерацию межклеточного матрикса различных тканей. Секреторные формы LOX/LOXL модифицируют и растворимые белки, например, фактор роста фибробластов-2 (FGF-2) [142] и трансформирующий фактор роста β (TGF- β) [130]. Так называемые несекреторные формы члены этого семейства могут локализоваться в цитозоле и в ядре, где они проявляют автономную активность [237]. В частности, белки LOXLs модифицируют гистоны 1 и 3, транскрипционный фактор Stat3, фактор TAF10 и другие [138, 141, 143].

2.2.4. Системы, осуществляющие безопасный круговорот меди в организме взрослых млекопитающих

Жизненно важные функции меди сочетаются с высокой токсичностью её свободных ионов. В биологической среде свободные ионы меди индуцируют каскад реакций типа Фентона и Хабер-Вайса, ведущих к образованию высоко токсичных АФК, которые могут локально накапливаться и вызывать разрушение или необратимую модификацию биополимеров, что вызывает окислительный стресс и гибель клеток [111]. Четыре системы участвуют в безопасном круговороте меди. Две из них внутриклеточные. Первая обеспечивает импорт меди в клетку и ее доставку к местам формирования купроэнзимов, вторая формирует пул для меди, обратимо связывающейся с регуляторными белками. Третья система обеспечивает транспорт меди от ЖКТ к печени, а четвертая – от печени к остальным органам. Круговорот меди по этим маршрутам связан с изменением состояния окисления $\text{Cu(I)} \leftrightarrow \text{Cu(II)}$.

2.2.4.1. Внутриклеточный транспорт меди к местам формирования купроэнзимов

Наиболее детально изучена внутриклеточная транспортная система меди (ТСМ), доставляющая ее ионы к местам формирования купроэнзимов. Система переносит медь в состоянии окисления Cu(I) и консервативна от дрожжей до человека. У млекопитающих ТСМ состоит из самого большого числа участников, набор и уровень экспрессии которых характеризуются тканевой специфичностью и зависит от периода онтогенетического развития, типа клетки и роли органа в метаболизме меди [28, 62, 83, 140]. Общим свойством этих белков является наличие медь-связывающего домена, включающего, как правило, мотив с двумя остатками цистеина (СХС, или СХХС), который образует бидентатный Cu(I)-связывающий центр с координационным числом 2. Белки-транспортёры образуют цепочки, по которым, меняя холо-форму на апо-форму, они при прямом взаимодействии передают ион Cu(I) друг другу в направлении повышения аффинности их медь-связывающих мотивов из внеклеточного пространства в различные компартменты клетки. Для взаимодействия с соответствующими партнерами транспортёры имеют 2 домена: один из них характерен для апо-формы и обеспечивает связывание с донором меди, второй служит для связывания с реципиентом меди, находящимся в апо-форме. Cu(I)-шапероны, которые встраивают медь непосредственно в купроэнзимы, содержат домены, связывающиеся с апо-формой этих ферментов. При общем сходстве механизма передачи меди белки ТСМ относятся к разным типам: растворимые и интегральные трансмембранные (каналоподобные переносчики или активные насосы). Условием для переноса меди через мембраны и ее перераспределения в клетке является изменение состояния окисления Cu(I)/Cu(II).

Ключевым звеном ТСМ, обеспечивающим включение абсорбированной меди в клеточный метаболизм, является высокоаффинный импортер меди 1 (CTR1, кодируемый геном *SLC31A1*), который экспрессируется в клетках всех тестированных органов [54, 203]. CTR1 функционирует как гомотример, он располагается на плазматической мембране и является единственным

универсальным высоко аффинным импортером меди. Принимая во внимание многообразные биологические роли меди и роль CTR1 в ее поступлении в клетку, не удивительно, что врожденные изменения структуры в гене CTR1 приводят к тяжелым, несовместимым с жизнью нарушениям [159]. Поступление меди через CTR1 регулируется на транскрипционном [201] и пост-трансляционном уровнях [70, 90]. Мономер CTR1 человека состоит из 190 а. о., формирующих три стандартных функционально-топологических домена: *внеклеточный, трансмембранный и цитозольный* (Рис. 4). Первый содержит три мотива, обогащенных в различных комбинациях остатками His and Met, которые могут связывать или Cu(I), или Cu(II), или оба [246]. Трехмерная структура внеклеточного домена CTR1 и взаимное расположение металлсвязывающих сайтов допускает, что восстановление Cu(II)→Cu(I) может происходить внутримолекулярно, подобно тому, как оно осуществляется в бактериальных белках [123]. Между медь-связывающими мотивами располагаются сайты N- and O-гликозилирования. N-гликан повышает способность CTR1 связывать медь, в то время как O-связанная углеводная цепь защищает NdCTR1 от расщепления внеклеточной протеазой, вызывающего снижение транспорта меди [176, 203]. Трансмембранный домен состоит из трех α-спиралей, пересекающих мембрану с образованием экстремально короткой (3 а.о.) внеклеточной петли и 49-членной цитозольной петли. В гомотримере 9-членный α-спиральный домен за счет двух остатков Met во второй α-спирали (M150 и M154) мономера формирует конусообразную купрофильную пору, по которой медь перемещается без затраты энергии [221]. Оба остатка требуются для медь-стимулированного эндоцитоза и деградации CTR1 [116]. Вероятно, благодаря короткой внеклеточной петле, вторая и третья α-спирали сближены, что способствует формированию внеклеточных Met/His кластеров, критичных для импорта меди [86]. Длинная цитозольная петля облегчает передачу Cu(I) от С-конца CTR1 к цитозольным шаперонам [89]. Короткий, 15-членный цитозольный домен содержит на С-конце Cu(I)-связывающий мотив His-Cys-His, который передает медь на цитозольные Cu(I)-шапероны, доставляющие медь к местам металлирования купроэнзимов [54, 85].

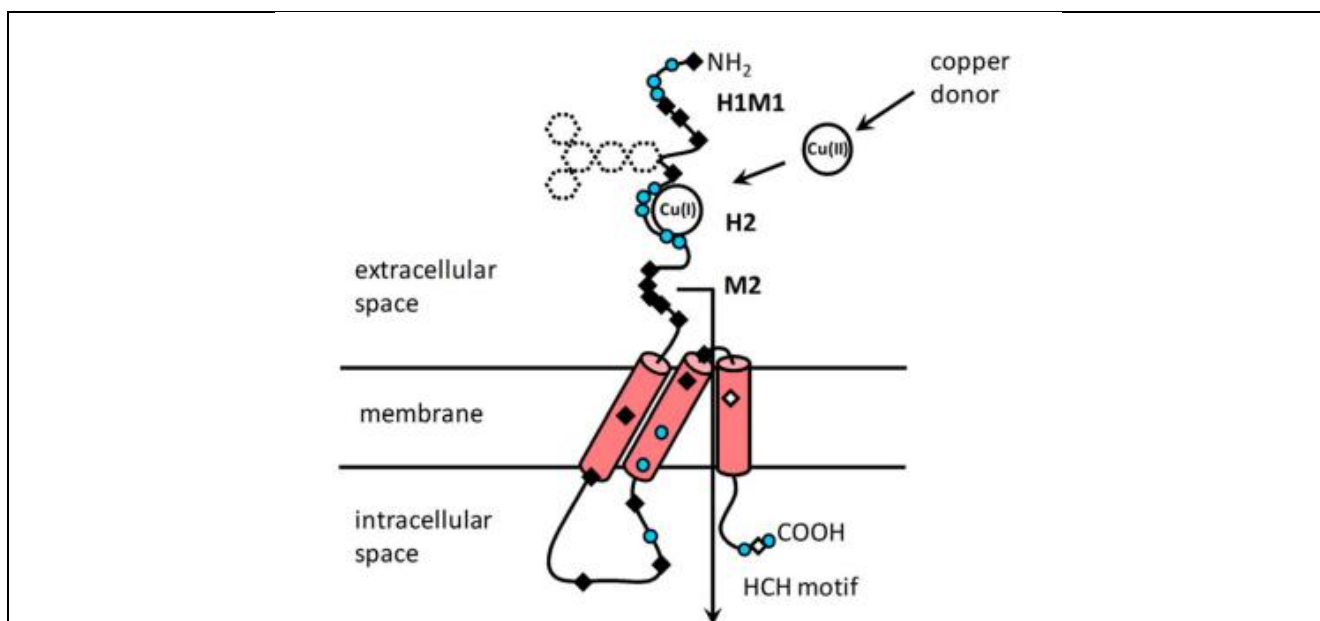


Рис. 4. Схема строения мономера CTR1. Положение N-гликан glycan показано точечными шестиугольниками. Остатки аминокислот в мотивах связывающих Cu(I)/Cu(II): голубые кружки — His, черные ромбики — Met, белый ромбик — Cys; H1M1, H2, M2 — медь-связывающие сайты внеклеточного домена NdCTR1 [176].

В настоящее время известны три мишень-специфических Cu(I)-шаперона. Это маленькие цитозольные белки: CCS, доставляющий медь к апо-SOD1; COX17, транспортирующий медь к митохондриальным Cu-шаперонам, встраивающим медь в ЦЦО и в СОД1, локализуемой в межмембранном пространстве; а также АТОХ1, передающий медь на цитозольные медь-связывающие сайты двух медь-транспортных АТФаз Р1 типа, локализующихся на мембранах цис-сети Гольджи и участвующих в металлировании секреторных купроэнзимов и выведении избытка меди (Рис. 5).

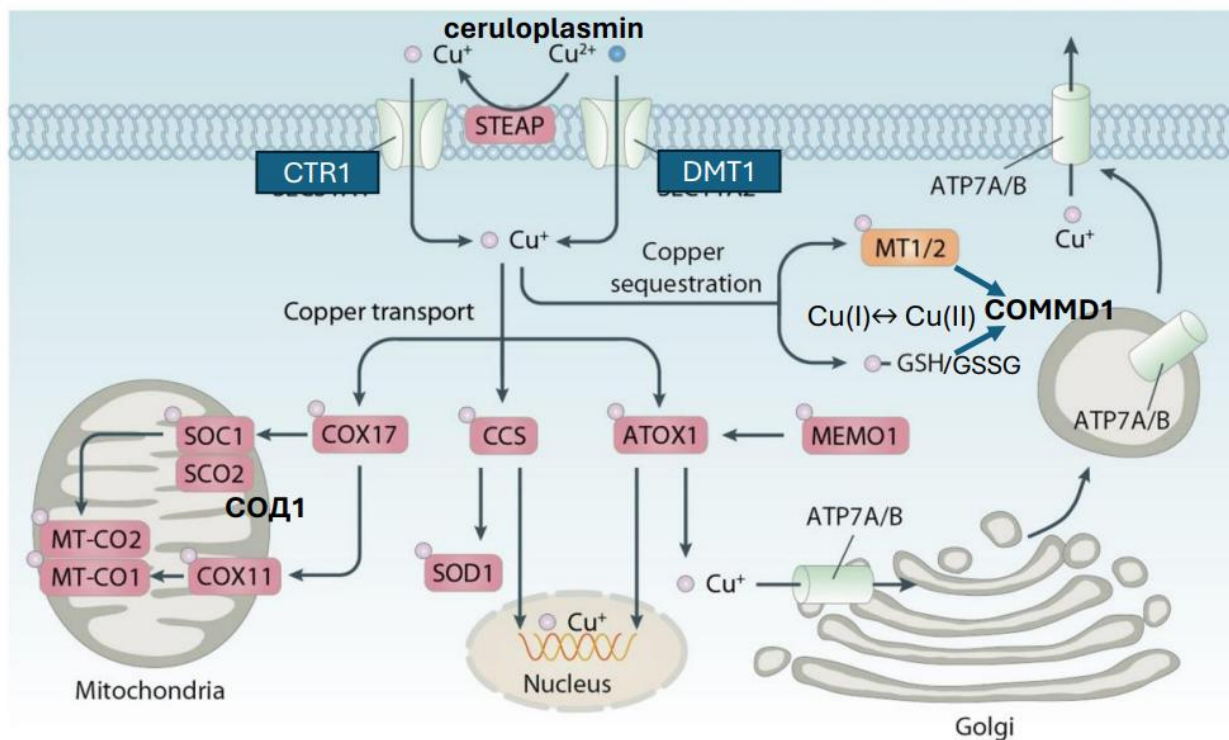


Рисунок 5. Упрощенная схема поступления и распределения меди в обобщенной клетке млекопитающих (Модифицировано из [82]).

У млекопитающих есть две медь-транспортные АТФ-азы Р1 типа: АТР7А и АТР7В соответственно АТФ-аза Менкеса и АТФ-аза Вильсона. Они получили свои названия по заболеваниям, которые развиваются вследствие мутаций в их генах: соответственно болезнь Менкеса (тотальный дефицит меди) и болезнь Вильсона (токсическое накопление меди в печени, мозге и других органах). Они имеют консервативную, общую для всех членов многочисленного семейства, объединяющего АТФазы Р типа различных филов, транспортирующие ионы металлов, фосфолипиды и полиамины, доменную организацию единственной полипептидной цепи [54, 169]. Фамильные сигнатурные мотивы молекул АТР7А/В, локализованные на цитозольных петлях, содержат фосфатазный домен, домен фосфорилирования и АТР-связывающий домен (Рис. 6).

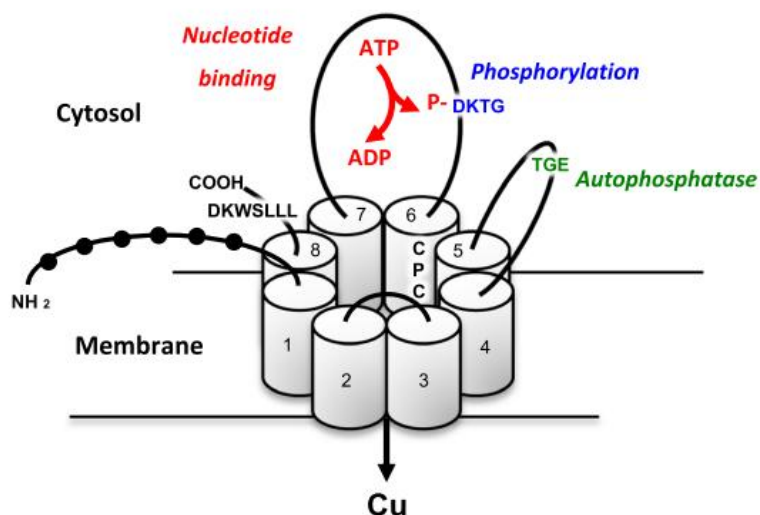


Рисунок 6. Схематическое изображение структуры АТР7А/В. (См. описание в тексте. Приведено с разрешения авторов [169].

Трансмембранный домен формируется восемью α -спиралями, из них четыре на С-конце образуют медь-трансдуцирующий канал, содержащий СРС-мотив, необходимый для транспорта меди. На цитозольном N-конце располагаются 6 медь-связывающих мотива, имеющих последовательность GMTCSXXC, которая связывает Cu^{1+} цистеиновой парой со стехиометрией 1 атом меди на 1 металлсвязывающий повтор [169]. Ионы меди к обеим АТФаза доставляет АТОХ1 (Рис. 5). АТР7А и АТР7В имеют не только сходную молекулярную организацию, но демонстрируют почти 50% идентичность первичной структуры. В то же время они выполняют специфические функции в метаболизме меди [54]. У взрослых млекопитающих АТР7А и АТР7В экспрессируются органо-специфично: АТР7В преимущественно экспрессируется в печени, АТР7А – в остальных органах. Обе АТФазы используют энергию гидролиза АТФ для переноса меди из цитозоля в люмен аппарата Гольджи, где она включается в активные центры секреторных купроэнзимов. Они демонстрируют биосинтетическую специфичность в отношении металлирования купроэнзимов. Так, АТР7А металлирует РАМ, тирозиназу, лизил оксидазу и LOXL, мембранные феррооксидазы, в то время как АТР7В металлирует секреторный ЦП. В круговороте меди эти АТФазы выполняют противоположные функции. Так, АТР7А ответственна за перенос абсорбированной меди в кровоток, а АТР7В за экскрецию меди через желчь. Это хорошо совпадает с

тем, что мутации в их генах, как указано выше, приводят к развитию противоположных фенотипов [125].

2.2.4.2. Система, создающая внутриклеточный пул меди, из которого её мобилизуют медь-зависимые регуляторные белки

Маршруты меди в состоянии окисления Cu(II), требуемой для аллостерической регуляции белков мало изучены. Чтобы медь могла осуществлять регуляторную функцию необходимо выполнение двух условий: наличие пула меди, который аккумулирует и легко освобождает ее, и существование медь-регулируемых сенсоров. Ряд косвенных данных указывают на то, что эти условия выполняются, однако, пока они остаются не полностью изученными. Так, в клетках существует два пула меди, которые могут принимать участие в быстром локальном изменении ее концентрации.

Первый из них обеспечивает система, включающая металлотионеин-Cu(I), глутатион/окисленный глутатион (GSH/GSS), связывающий Cu(I) и восстанавливающий его до Cu(II), и COMMD1(Cu(II)) (Рис. 5). В этой системе белками являются медь-связывающие белки металлотионеин (MT) и COMMD1 [62]. В семейство MT входят белки с молекулярной массой 7–10 кДа, содержащие более 20 сульфгидрильных групп на молекулу и способностью связывать и обезвреживать ионы металлов. Благодаря высокому содержанию сульфгидрильных групп MT связывает Cu(I) с образованием меркаптидов. MT найдены у всех организмов, включая бактерий. На основе таксономических параметров, паттерна распределения остатков цистеина в молекуле MT, а также присутствия остатков гистидина выделяют 15 семейств. У млекопитающих описаны 4 изоформы MT: MT1–4. Они экспрессируются тканеспецифически: MT1 и MT2 экспрессируются во всех органах, но преимущественно в клетках кишечника и печени, MT3 – в мозге, в то время как MT4 – в клетках многослойного эпителия. При физиологических условиях MT связывает Zn(II) (7 атомов на молекулу) и Cu(I) (12 атомов на молекулу). Помимо этого, MT связывает абиогенные тяжелые металлы, в первую

очередь, кадмий. Таким образом, МТ выполняют 2 функции: поддерживают гомеостаз Zn и Cu и участвуют в детоксикации абиогенных тяжелых металлов [69].

Концентрация МТ в сыворотке здоровых людей, ранее считавшегося исключительно клеточным белком, составляет 10–30 нг/мл, и она увеличивается в несколько раз при стрессах, гепатоцеребральных и онкологических заболеваниях [155].

Глутатион осуществляет окислительно-восстановительный цикл меди, находящейся в комплексе с МТ [62]. В цитозоле ион Cu(I), находящийся в комплексе с МТ, может быть передан Cu(I)-шаперонам и доставлен к апо-купроэнзимам, а ион Cu(II) может быть связан цитозольным белком COMMD1 (copper metabolism (Murr1) domain-containing protein 1). COMMD1 – член семейства белков, сигнатурой которых является наличие на С-конце высоко консервативного домена COMMD, в котором кластеры гистидина отвечают за связывание Cu(II). Этот домен также содержит два сигнала ядерного экспорта, что позволяет допустить участие COMMD1 в распределении меди между ядром и цитозолем. Сайты на N-конце отвечают за связывание с различными партнерами. Это позволяет белку осуществлять множество функций, включая транспорт/экскрецию меди, транспортировку/деградацию белка, регуляцию репликации вируса, воспаление, возможную роль в онкологии [233]. Белки COMMD участвуют в снижении активности NF-κB, медь-зависимого транскрипционного фактора, который является последним звеном ряда сигнальных путей, в том числе участвующих в иммунном ответе. Таким способом COMMD предотвращает развитие хронического воспаления, вызывающего нарушение работы органов [61].

Участники системы МТ-Cu(I), GSH/GSS – Cu(I)↔Cu(II), и COMMD1(Cu(II)) связывают медь, меняют её состояние окисления и могут возвращать в систему, металлирующую купроэнзимы, или в сигнальные пути, или экскретировать её из клетки. В этой системе Cu(I), импортированный через CTR1, может быть окислен до Cu(II) иона, который может быть использован регуляторными белками.

Второй пул меди, по-видимому, принадлежит митохондриями как внутриклеточным депо меди. Показано, что у дрожжей и млекопитающих

митохондрии аккумулируют медь из цитозоля и освобождают ее в цитозоль с помощью халькофора, маленького (около 1 кДа) вещества неустановленной структуры. Благодаря этому в цитозоле концентрация не энзиматической меди может быть быстро изменена [59].

Из внеклеточного пространства Cu(II) , без восстановления, минуя CTR1, может поступать в клетки через белок DMT1 (транспортер двухвалентных металлов 1). Белок DMT1 функционирует как протон-сопряженный насос, использующий для активного транспорта трансмембранный потенциал. Он импортирует железо как Fe(II) ион, а также ионы Mn(II) , Zn(II) , Cu(II) , Ni(II) , Co(II) , Pb(II) и Cd(II) . Он экспрессируется повсеместно, особенно им обогащена апикальная мембрана энтероцитов двенадцатиперстной кишки [33]. Вероятно, ионы Cu(II) , поступающие через DMT1, могут не только поступать в цикл GSH/GSSH, но и прямо использоваться в качестве эффектора медь-зависимыми регуляторными белками. Так, на культивируемых клетках линии H1299 (клетки A549 не экспрессирующие белок p53), у которых с помощью CRISPR-Cas9 технологии был удален или ген *CTR1*, или ген *DMT1*, показано, что профили экспрессии регуляторных белков отличаются [9]. Используя эти же линии клеток и специфичный для степени окисления Cu(II) флуоресцентный сенсор, было показано, что лабильный пул меди(II) регулирует окислительно-восстановительные изменения в онкогенах [164].

Клетки различных органов также имеют систему реутилизации меди, содержащейся в купроэнзимах. Так, в эндосомах и лизосомах локализуется белок CTR2, по первичной структуре и доменно-функциональной организации гомологичный CTR1 [203]. Здесь также присутствуют белки, принадлежащие семейству металлоредуктаз STEAP, в том числе и куприк-редуктаза STEAP4, восстанавливающая в эндосомах Cu(II) в Cu(I) [127]. Возможно, благодаря совместной работе STEAP4/CTR2, медь в составе купроэнзимов, попадающих в эндолизосомальное пространство через эндоцитоз и макроаутофагию (медь митохондрий), может вернуться в пул GSH/GSSG биодоступной меди. Вероятно,

что в это же пул попадают ионы меди цитозольных купроэнзимов после их деградации через убиквитин-протеасомную систему.

2.2.4.3. Медь в циркуляции распределяется в различных пулах

Медь, выявляемую в цельной крови, разделяют по ее локализации на клеточную, плазменную и сывороточную. Медь в составе клеточных купроэнзимов (основная ее доля приходится на СОД1 эритроцитов) можно считать инертной, так как она не обменивается и не участвует в круговороте меди. Как правило, при исследованиях основное внимание уделяется меди, находящейся в сыворотке. У человека ее концентрация составляет примерно 0,9–1,5 мг на литр. Она связана с тремя белками: ЦП, α 2-макроглобулином (α 2-М, ранее транскупреин) и альбумином [50, 228, 235]. Эти белки от общего белка сыворотки соответственно составляют 0,035%, 8-10% и 50 – 60%. При этом с ЦП связано более чем 95% от общей меди [115], с α 2-М примерно 2–5%, а с альбумином не более 3–5%. Таким образом, ЦП – основной медьсодержащий белок крови. В экспериментах пульс-чейз типа показано, что радиоактивная медь всасывается в тонком кишечнике, специфически связывается с АТСUN-мотивом, расположенным на N-конце альбумина [43], и транспортируется к печени (Рис. 7).

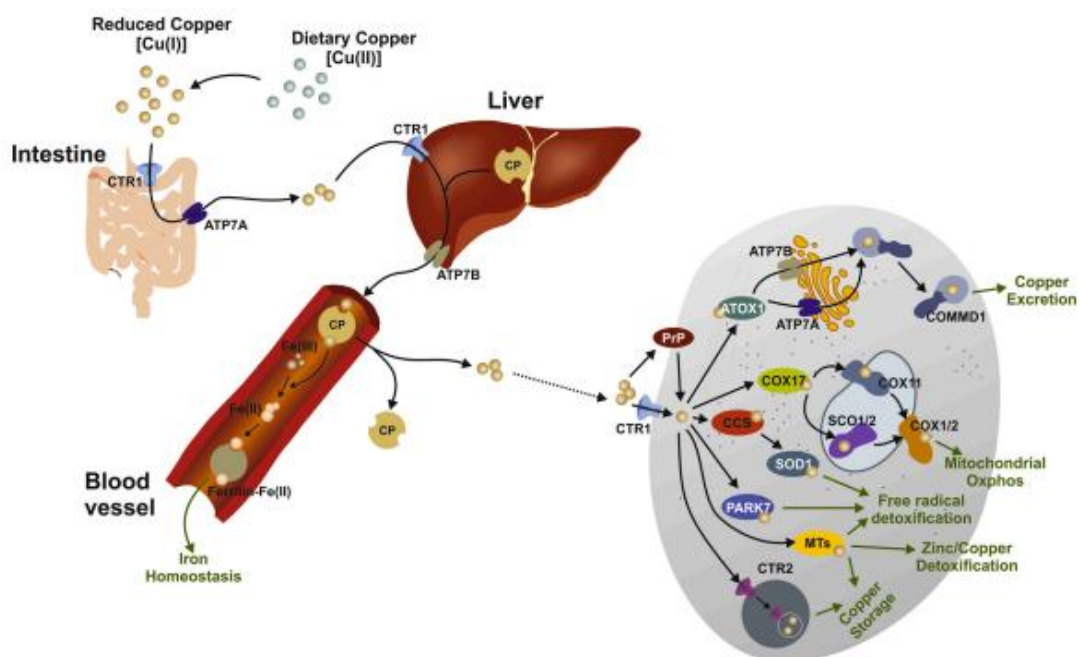


Рисунок 7. Круговорот биогенной меди в организме млекопитающих [233].

У плазматической мембраны гепатоцитов медь из молекулы альбумина переходит в комплекс с гистидином $(\text{His})_2\text{Cu}$ [228], поглощается через CTR1 и уже через 5–10 мин после введения оказывается в гепатоцитах. Возможно, что медь передается на CTR1 непосредственно альбумином [50]. Радиоактивная медь в $\alpha 2$ -М обнаруживается в общие с альбумином временные рамки [44]. Основной функцией $\alpha 2$ -М является его способность инактивировать протеазы, в том числе и продуцируемые патогенными микробами, необратимо связываясь с которыми, он модифицируется и становится узнаваемым для эндоцитозных рецепторов на мембране гепатоцитов [228]. Возможно, медь, связанная с $\alpha 2$ -М, поступает в гепатоциты эндоцитозом, а затем из лизосом попадает в цитозоль. Здесь она включается в ЦП и внутриклеточные купроэнзимы, связывается с МТ, или экскретируется через желчь. В опытах *in vitro* показано, что $\alpha 2$ -М обменивается медью с альбумином и может быть донором меди для культивируемых клеток [81]. Однако *in vivo* дефицит меди не влияет на активность гена $\alpha 2$ -М [228] и нет данных, указывающих на его способность участвовать в поддержании гомеостаза меди.

Радиоактивная медь, включенная в ЦП, оказывается в кровотоке не ранее чем через 1.5 часа после начала эксперимента (см. раздел 2.2.2). Позже она обнаруживается в разных органах. Молекула ЦП содержит 6–8 атомов меди, из которых 6 атомов входят в активные центры, а 2 атома слабо связаны с его пептидной частью, которые, вероятно, и передаются ЦП в клетки различных органов. По данным молекулярной динамики мотив CTR1₁₋₁₃, специфически сближается с областями ЦП, содержащими лабильные атомы меди [37]. Это хорошо согласуется с данными, продемонстрировавшими, что ЦП является универсальным донором биоценной меди [147].

У здоровых людей незначительное количество (меньше 10 мкг/Л) меди присутствует в комплексе с аминокислотами, или маленьким носителем меди неустановленной природы [185]. Эту часть сывороточной меди принято называть «свободной». При врожденных нарушениях экскреции меди через желчь, нейродегенеративных заболеваниях, ассоциированных с дисгомеостазом меди (болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера), концентрация «свободной» меди

может повышаться 10-кратно [24]. Не установлено, как формируется пул «свободной» меди, однако, он используется как маркер нарушения дисбаланса меди, величина которого пропорциональна степени заболевания [24, 185]. Для определения содержания «свободной» меди используют три основных показателя **статуса меди** в сыворотке крови: концентрацию атомной меди и концентрации ЦП, вычисленные по оксидазной и антигенной активности [150].

Неизвестно, выводится ли «свободная» медь из кровотока, или накапливается в нем. Возможно, она возвращается в клетку через прионовый белок (PrP). PrP имеет две молекулярные формы: секреторную и ГФИ-связанную [183], он присутствует в клетках всех тканей с преобладанием в нервной ткани, легких и печени. В то же время описано множество разнообразных и важных функций, выполняемых им, что позволяет определить его как плеiotропный белок [133]. Предполагают, что PrP принимает участие в метаболизме меди. Теоретически PrP может связывать медь в ходе созревания в секреторном пути клетки, получая медь в аппарате Гольджи от ATP7A/B и способствуя ее выведению из клетки [110]. Однако показано, что PrP, связавший медь, подвергается интернализации со скоростью, характерной для рецептор-опосредованного эндоцитоза [167]. Попад в кислый эндосомальный компартмент, медь освобождается от белка и может быть перенесена в цитозоль с помощью STEAP4/CTR2. По этому сценарию PrP может участвовать в импорте «свободной» меди в клетку [172].

Локальные изменения концентрации меди во внеклеточном примембранном пространстве могут возникать при секреции комплексов меди, образующихся с интерлейкинами, цитокинами, факторами роста и металлотионеинами (MT) в условиях стресса [82, 186].

2.3. СВЯЗЬ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА ГРИППА И ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ С МЕТАБОЛИЗМОМ МЕДИ ХОЗЯИНА

Данные, иллюстрирующие связь метаболизма меди хозяина с репродукцией ВГА и воспалительным процессом, вызванным им, обобщены в следующих тезисах

2.3.1. Металлирование СОД1.

Успешная и эффективная репликация ВГА требует увеличения продукции клеточных АФК. Хорошо известно, что дефицит ферментов, генерирующих АФК, например, за счет нокаута генов или селективных ингибиторов, снижает повреждение легких, вызванное ВГА-инфекцией [55, 152]. ВГА в репликативном цикле использует как индукцию производства АФК, так и подавление антиоксидантной системы хозяина. В нормально функционирующих клетках конститутивное производство АФК тщательно контролируется, а виды АФК используются в качестве сигнальных молекул, которые могут модулировать рост, механизмы синаптической трансдукции и другие процессы [192]. К основным системам удаления АФК относятся цитозольные и митохондриальные СОД, пероксисомальные и цитозольные каталазы, пероксиредоксины, глутатионпероксидазы, тиоредоксины и глутатион [151]. Активность генов, ответственных за антиоксидантную защиту, регулируется факторами транскрипции, содержащими тиоловые группы, которые действуют как редокс-чувствительные переключатели. При субтоксических концентрациях АФК повышают активность генов, кодирующих антиоксиданты и белки, поглощающие АФК. Это позволяет осуществлять контроль клеточного окислительно-восстановительного баланса [153]. В клетках, инфицированных ВГА, стимулируется активность АФК-продуцентов [152]. Объектами ВГА-специфического подавления антиоксидантной защиты клетки-хозяина являются все ее основные участники. В первую очередь это – СОД1, основной купроэнзим цитозоля (см. раздел 2.2.2). Он имеет самый большой ккат/кМ среди всех известных ферментов ($\sim 7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) и сохраняет свою активность в широком диапазоне значений pH и температуры. Уровень активной холо-СОД1 поддерживается наличием постоянного пула апо-СОД1, который может быть преобразован в холо-СОД путем переноса иона меди из Cu(I)-шаперона CCS (Рис. 5).

ВГА подавляет активность СОД1 различными способами. В клетках A549, инфицированных ВГА, активность гена SOD1 падает практически до нуля, как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции, а содержание вирус-

специфических белков возрастает пропорционально дозе заражения. Абиогенный антиоксидант N-ацетилцистеин или суперэкспрессия СОД1 нейтрализуют ВГА-индуцированное производство АФК и повышают выживаемость клеток [55]. Подавление экспрессии СОД1, индуцированное ВГА, опосредуется подавлением активности гена Sp1. Гриппозная инфекция вызывает резкое снижение количества зрелых транскриптов гена Sp1. Параллельно существующие молекулы Sp1 подвергаются расщеплению и деградации в протеасомах [55]. Падение уровня белка Sp1 вызывает снижение экспрессии гена SOD1, так как проксимальная часть промотора гена СОД1 содержит кластер цис-элементов (GC-rich box) для белка Sp1, который является конститутивным активатором транскрипции генов домашнего хозяйства, а также генов с промоторами без ТАТА-бокса [163]. Существующие данные позволяют предположить, что путь металлирования СОД1 можно рассматривать как медь-зависимый элемент репликации ВГА и потенциальную мишень противовирусных стратегий.

2.3.2. Пара АТР7А/аутофагосома.

Продуктивная репликация ВГА индуцирует аутофагию в клетке-хозяине, этот клеточный процесс представляет собой один из способов деградации долгоживущих белков и поврежденных органелл. Биогенез аутофагосом, индуцированный ВГА, используется им на разных стадиях репликации: для высвобождения вирусного генома из эндосом, а также продукции инфекционных вирусных частиц [120]. Более того, аутофагия также приводит к снижению активности СОД1 [124]. Установлена связь между АТР7А и активностью аутофагосом и показана важность обоих путей для эффективного экспорта меди [120]. Подавление образования аутофагосом спаутином (специфическим синтетическим ингибитором аутофагии) способствует репликации вируса гриппа [18], возможно, за счет блокирования опосредованного аутофагосомами пути экспорта меди [8]. Таким образом, пару АТР7А/аутофагосома можно рассматривать как звено метаболизма меди, которое направлено на блокирование репродукции ВГА.

2.3.3 Импорт и выведение меди.

Первые убедительные доказательства того, что для эффективной репликации ВГА необходим физиологический баланс между импортом и экскрецией меди, были получены на культивируемых эпителиальных клетках легких человека (линия A549) с нокдауном генов CTR1 или ATP7A с помощью РНК интерференции [14]. Оба этих переносчика меди с противоположными функциями во внутриклеточном балансе меди необходимы для репликации ВГА.

2.3.4. Прионный белок.

В последние годы накапливаются данные о влиянии нативного PrP на репликацию ВГА. Роль PrP в патогенезе прионовых конформационных заболеваниях общепризнана, но его нормальная физиологическая роль до сих пор не ясна [93] (DeFranco&Telling, 2025). Фенотипы мышей с нулевым PrP были неинформативными: они не демонстрировали каких-либо серьезных анатомических нарушений или нарушений развития [160]. В то же время растет количество данных, свидетельствующих об участии PrP в поддержании баланса меди. Это предположение хорошо согласуется со структурой и биохимическими свойствами ГФИ-PrP [133, 183]. Белок состоит из 2 коротких бета-цепей и 3 стабилизирующих альфа-спиралей. Неструктурированный N-концевой домен PrP содержит около 100 аминокислотных остатков. В нем локализован мотив консервативной последовательности, который образован нонапептидом PQGGGGWGQ, за которым следуют 4 аналогичных октапептидных повтора (PHGGGGWGQ). Каждый октапептидный повтор может связывать один ион Cu(II). Два остатка, His96 и His111, могут связывать еще ион Cu(II). Так, N-концевой домен PrP может связывать до 5 ионов меди(II). *K_a* для связывания меди с PrP находится в фемтомолярном диапазоне (10^{-14} М), поэтому PrP связывает медь в пределах физиологического диапазона концентраций [171]. В то же время связывание других двухвалентных катионов, таких как Ni(II), Zn(II) или Mn(II), с PrP слабее на три и более порядков [136]. Эти свойства позволяют PrP действовать как члену гомеостатической системы меди. Одной из предполагаемых функций PrP является подавление токсичности АФК, возможно, за счет модуляции функции СОД1 [38].

Поскольку CTR1 имеет значительно меньшее сродство к меди ($K_m \approx 2 \cdot 10^{-6}$ М), чем PrP, маловероятно, что PrP может передавать медь CTR1 на клеточной мембране [64]. Механизм транспорта меди, связанный с PrP, возможно, связан с кавеолин-1-, клатрин- и рафт-зависимым эндоцитозом [183]. В любом случае, связавший медь PrP, попадает в лизосомы. При низких значениях pH ионы меди диссоциируют и могут быть перенесены в цитозоль с помощью STEAP4/CTR2 [127]. Работы японских исследовательских групп убедительно продемонстрировали, что PrP играет защитную роль при инфекции гриппа А. Они показали, что PrP активно экспрессируется в альвеолярных и бронхиолярных клетках легочного эпителия. Интересно, что легочная ткань содержит наибольшее количество PrP среди ненейронных тканей, а разрыв между концентрацией PrP в мозге и в легких не велик [173]. У мышей, лишенных PrP (Prnp0/0), по сравнению с мышами дикого типа, инфекция ВГА вызывала более высокую смертность, более обширное повреждение легких, более высокий титр вируса в легких и большую потерю веса. В легочной ткани мышей линии Prnp0/0 повышались концентрация АФК и активность ксантиноксидазы, а активность СОД1 снижалась. Эктопическая экспрессия гена PrP без медьсвязывающих доменов у мышей Prnp0/0 не восстанавливала нормальный уровень устойчивости к инфекции, вызванной ВГА. Сумма этих данных позволила авторам считать, что защитная функция PrP связана с его медь-связывающей активностью и спасением SOD1 [173]. Более того, данные, полученные этой же группой исследователей, выявили еще один возможный механизм PrP-опосредованной защиты мышей от гриппозной инфекции. Это связано со способностью PrP индуцировать противовоспалительную поляризацию макрофагов M2 посредством активации киназ семейства Src (SFK). Активированные макрофаги M2 подавляли воспаление и защищали мышей от летального действия ВГА [174].

2.3.5. Церулоплазмин.

Первые данные, показывающие связь между экспрессией гена ЦП и инфекцией ВГА, были получены более 65 лет назад [131]. Увеличение концентрации холо-ЦП в сыворотке крови начинается на ранней стадии инфекции,

высокий уровень ЦП сохраняется на протяжении всего периода инфекции и положительно коррелирует с тяжестью заболевания [112]. Возможно, эффект обусловлен повышением уровня цитокинов, характерным для гриппозной инфекции, так как промотор гена *ЦП* содержит *цис*-элементы специфические для интерлейкинов [78]. Также возможно, что реакция ЦП на гриппозную инфекцию объясняется тем, что он относится к белкам острой фазы [213].

Исследователи из Института вирусологии (Бухарест, Румыния) предложили гипотезу «ловушки», согласно которой ЦП подавляет инфекцию ВГА, улавливая вирус в комплексы гликопротеинов вирусной оболочки с углеводными цепями ЦП [222]. В рамках этой гипотезы важно, что ЦП всех видов млекопитающих имеет 2–3 углеводных блока с N-ацетилнейраминовой кислотой (NANA) в концевом положении. В большинстве случаев NANA связана с остатком галактозы через углерод-6 посредством α -2,6-связи. Именно этот тип связи распознается НА ВГА [222]. Эта гипотеза подтверждается следующими экспериментальными данными. Основные гликопротеины мембраны оболочки вируса НА и NA, определяющие инфекционность, взаимодействуют с ЦП и асиало-ЦП и образуют комплексы с различной степенью стабильности. Виреоны, НА и NA которых блокировались ЦП, уже не могли взаимодействовать с гликопротеинами плазматической мембраны клеток-мишеней и инфицировать эти клетки. Кинетические константы связывания ВГА с ЦП хорошо соответствовали субстрат-специфическому взаимодействию. Гипотеза «захвата» была также подтверждена данными о связи концентрации ЦП в крови и репликации ВГА. Ингибирующее действие ЦП наблюдалось при репликации вируса в куриных эмбрионах, фрагментах хориоаллантоисной мембраны и при инокуляции мышам. Эффект зависел от способа введения [223]. Так, наиболее эффективное ингибирование репликации вируса наблюдалось при инкубации вируса с ЦП перед инокуляцией. Введение ЦП одновременно с вирусом или после инокуляции не было эффективным ни *in vitro*, ни *in vivo*. Наибольший защитный эффект был получен, когда мышам перед инокуляцией ВГА вводили ЦП [77]. Эффект имел выраженную зависимость от дозы. Выжившие мыши, получившие предварительную инокуляцию ЦП, продемонстрировали самый

высокий уровень защиты от повторного заражения [77]. Авторы гипотезы «ловушки» предположили, что ЦП на ранних стадиях инфекции действует как уловитель вирионов; тогда как на поздних стадиях инфекции ЦП действует как внеклеточная супероксиддисмутаза и нейтрализует продукты окислительного стресса, вызванного вирусом [224]. Если предложенная гипотеза верна, остается не ясным, какой ЦП, печеночного, или легочного происхождения, защищает от вирусной инфекции. До развития ОТ-ПЦР анализа было показано, что в легких крыс образуется только один продукт транскрипции гена *Ср* (для обозначения гена, кодирующего ЦП, в тексте сохраняется международное название гена – *Ср*), его уровень растет в ходе эмбрионального развития, а затем падает до неопределяемых уровней в постнатальном периоде [102]. В то же время индуцированное эндотоксином воспаление в легких взрослых крыс характеризовалось значительным повышением активности гена ЦП [103]. Эти данные были получены методом норзерн-блот гибридизации, поэтому не уточнялось, присутствует ли одна или обе сплайс-формы ЦП-мРНК в легких во время воспаления и в каких концентрациях. Тот факт, что ЦП присутствует в белковой фракции бронхиального секрета здорового человека, указывает на то, что внеклеточный ЦП может синтезироваться легкими, однако, его количество не превышает 13 % от ЦП сыворотки [135]. Неизвестно, синтезируют ли клетки легких изоформу ГФИ-ЦП. Если ГФИ-ЦП присутствует на клеточной мембране клеток легких, он гипотетически может снижать инфекционность ВГА, конкурируя с гликопротеиновыми рецепторами за связывание НА. В то же время существует вероятность, что ГФИ-ЦП может способствовать переносу связавшегося с ним вируса в клетку, так как он локализуется на липид-богатых платформах, которые интернализуются посредством кавеолин-опосредованного эндоцитоза.

В связи с ролью ЦП в защите организма от вирусной инфекции естественным является вопрос, имеют ли значение антиоксидантные свойства ЦП для защиты клеток от АФК, образующихся в ходе инфекции. Во внеклеточном пространстве присутствует СОД3, которая по каталитической активности сравнима с СОД1, в то время как супероксид дисмутазная активность ЦП ниже активности СОД1 почти в

100 раз [145]. Соотношение ЦП/СОД3 в сыворотке крови составляет около 2000:1 (0,3 мг/мл и 0,18 мкг/мл соответственно). Во внеклеточной жидкости легких это соотношение смещается в сторону СОД3, так как здесь концентрация ЦП существенно ниже, а уровень экспрессии СОД3 самый высокий, по сравнению с другими органами [146]. В целом все эти данные позволяют предположить, что СОД-активность ЦП не важна для защиты от вирусной инфекции.

2.3.6. *COMMD1*

Установление белков хозяина, участвующих в защите от гриппозной инфекции, или стимулированных ею, осуществляют также с помощью экспериментального подхода, основанного на сравнении белковых паттернов различных компартментов у здоровых людей и пациентов, инфицированных ВГА. В исследовании, выполненном на культивируемых макрофагах, было показано, что у пациентов, белки секретируются как через классический секреторный путь: эндоплазматический ретикулум → аппарат Гольджи → плазматическая мембрана, так и с помощью не традиционной секреции через образование выпячиваний на плазматической мембране, которые после «слищивания» становятся экстрацеллюлярными везикулами (ЭВ) [187]. С помощью протеомики, биоинформатики и функциональных исследований было продемонстрировано, что ЭВ, освобожденные макрофагами пациентов, инфицированных ВГА, содержат семь из десяти белков семейства COMMD и белки, связанные с аутофагией. При этом ни один из них не был обнаружен в ЭВ, образованных макрофагами здоровых пациентов [177]. Функции COMMD1 в поддержании гомеодинамики меди уже были рассмотрены выше (см. раздел 2.2.2). Упоминалось, что COMMD1 является убиквитин лигазой для NF-κB, поэтому связываясь с NF-κB, центральным фактором транскрипции, который регулирует иммунный ответ и воспаление, COMMD1 подавляет его экспрессию. Присутствие этих белков в ЭВ может свидетельствовать о том, что ЭВ, индуцированные ВГА, играют важную роль в регуляции экспрессии генов в клетках-мишенях. Инфекция ВГА вызывает рекрутирование белков COMMD в ЭВ, что, возможно, дополнительно указывает на пересечение путей метаболизма меди с гриппозной инфекцией и указывает на роль

белков COMMD и в противовирусной защите [177]. Идентификация этих белков в ЭВ может свидетельствовать о том, что ЭВ, индуцированные ВГА, играют важную роль в регуляции экспрессии генов в клетках-мишенях. Эти результаты указывают на еще одно звено пересечения путей метаболизма меди с гриппозной инфекцией.

2.4. УПРАВЛЯЕМОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СТАТУСА МЕДИ

2.4.1. Химические и биологические свойства серебра

Как уже упоминалось выше, уровень ЦП повышается при любых инфекциях. Так как ЦП входит в группу белков острой фазы, это можно рассматривать, как ответ хозяина на инфекцию. С другой стороны, повышение уровня ЦП можно рассматривать, как сигнал патогенов, увеличить уровень биоценной меди [63]. Поэтому именно холо-ЦП является тем звеном метаболизма меди, модуляция которого может быть использована для борьбы с патогенами. Систематические исследования в этом направлении проводятся отделе Молекулярной генетики ИЭМ с 2008 г. [28, 32, 48, 158, 198, 216]. В целом, они посвящены изучению ранее описанного феномена, состоящего в способности ионов серебра снижать оксидазную активность ЦП [184]. Природа этой особенности абиогенного серебра состоит в его физико-химическом сходстве с медью Cu(I) [249]. Серебро (47 элемент таблицы Менделеева), как и медь, является *d*-элементом, у них сходная электронная конфигурация: $[Kr]4d^{10}5s^1$, то есть эти элементы изоэлектронны. Ионы Ag(I), подобно Cu(I), хорошо восстанавливаются до Ag(0), диаметры их атомов близки, а координационные свойства схожи [246]. Ag(II) не стабилизируется молекулами воды, ион в водной среде не существует, а известные отдельные комплексы Ag(II) в присутствии воды мгновенно восстанавливаются до Ag(I). И в то время как пара Cu(I)/Cu(II) используется почти во всех базовых процессах в клетке, не стабильная пара Ag(I)/Ag(II) остается абиогенной. В биологической среде Ag(I) легко восстанавливается до Ag(0), который легко теряет электрон и окисляется до Ag(I). Эта активность может сопровождаться освобождением электронов, вызывающих образование АФК [28]. По-видимому, этим объясняются антибактериальные свойства серебра [211]. Биологическое действие ионного

серебра и серебра, диссоциирующего с поверхности наночастиц (AgNPs), одинаково [28, 226]. Популярность и широкое использование AgNPs определяются их физико-химической стабильностью в аэробных водных средах.

Для производства AgNPs используют химические, физические и зеленые методы, а также их различные модификации [65, 197]. Обычно в качестве сырья используют нитрат серебра. В качестве восстановителей применяют неорганические, органические соединения, а также экстракты, полученные из биообъектов. Размер образующихся AgNPs зависит от условий реакции, концентрации ввода и присутствия других молекул. Условно наночастицами считаются компактные металлические частицы с линейным размером, хотя бы в одном направлении, от 1 до 100 нм. Сферические, или почти сферические, AgNPs являются наиболее стабильными и используемыми. В большинстве исследований применяют AgNPs с покрытием для повышения коллоидной стабильности и уменьшения агрегации. Покрытие обычно состоит из полярных или амфипатических органических молекул, которые нековалентно связаны с металлическим ядром [234]. Дисперсии AgNPs обладают специфическими оптическими и фотофизическими свойствами. Они имеют характерную полосу поглощения в видимой или ближней УФ-областях спектра. Эта полоса вызвана плазмонным резонансом металлического ядра. Основными критериями чистоты AgNPs являются резкие максимумы рентгеновской или электронной дифракции, свидетельствующие о монокристаллической структуре.

Важно отметить, что изучение биологической активности AgNPs, осуществляется с использованием препаратов наночастиц, произведенных для данного исследования. Это происходит потому, что коммерческие AgNPs не соответствуют заявляемым характеристикам [129]. Молекулярный механизм, обеспечивающий антибактериальную активность AgNPs, изучается на различных видах прокариотических и эукариотических одноклеточных патогенах, при этом сравнивается действие AgNPs в зависимости от их способа изготовления, линейного размера, формы и покрытия [65]. Обобщение данных многочисленных исследований, выполненных к настоящему времени, показывает, что наиболее

эффективными являются сферические AgNPs с диаметром примерно 10–20 нм, а наиболее чувствительными к ним являются грамм-отрицательные бактерии [211]. Считается, за бактерицидные свойства AgNPs ответственны токсические АФК, образующиеся при корродировании частиц в биологической среде (Рис. 8). Вероятно, цитотоксическое действие AgNPs на культивируемые клетки, полученные из различных органов млекопитающих, происходит по тому же механизму [91].

Считается, что *in vivo* для здоровых клеток млекопитающих, в отличие от раковых, AgNPs безвредны [66]. Однако прогрессивное увеличение использования AgNPs и рост контактов с ними всех групп людей стимулирует исследования токсических свойств AgNPs. Показано, что у лабораторных грызунов хронический пероральный прием AgNPs (28 дней) вызывает окислительный стресс в дозозависимой манере [190], приводит к накоплению атомного серебра в первую очередь в клетках печени и почек [226]. Нагрузка AgNPs, или ацетатом серебра, через зонд в такой же период времени вызывает накопление серебра в слизистой кишечника, печени, почках, легких и мозге (указаны в порядке снижения концентрации), а также в межклеточных пространствах. У этих животных трансмиссионная электронная микроскопия выявила присутствие нанокорпускул в лизосомах клеток кишечника, спектры энергодисперсионного рентгеновского излучения которых соответствуют кристаллическому серебру. В печени такие образования не обнаружены [95]. Внутривенное введение AgNPs (от 0.5 до 6 мг/кг) крысам в течение месяца вызывает дозозависимое нарушение созревания клеток иммунной системы [210]. Пероральное введение AgNPs (от 30 до 700 мг/кг массы тела) в течение 28 дней вызывает драматические нарушения структуры коркового и мозгового слоев почек, индуцирует апоптоз [220]. Подкожное введение AgNPs в дозе 10 или 50 мг/кг массы тела в течение 14 или 28 дней показало, что уровень содержания каталазы, СОД1, глутатиона, малонового диальдегида в печени, почках и сердце, по сравнению с контролем, у крыс обработанных 10 мг/кг массы тела AgNPs в течение 14 дней не меняется, но достоверно меняется при обработке

высокой дозой AgNPs или более длительное время [96]. Обнаруженное токсическое действие *in vivo* AgNPs авторы связывают с действием окислительного стресса.

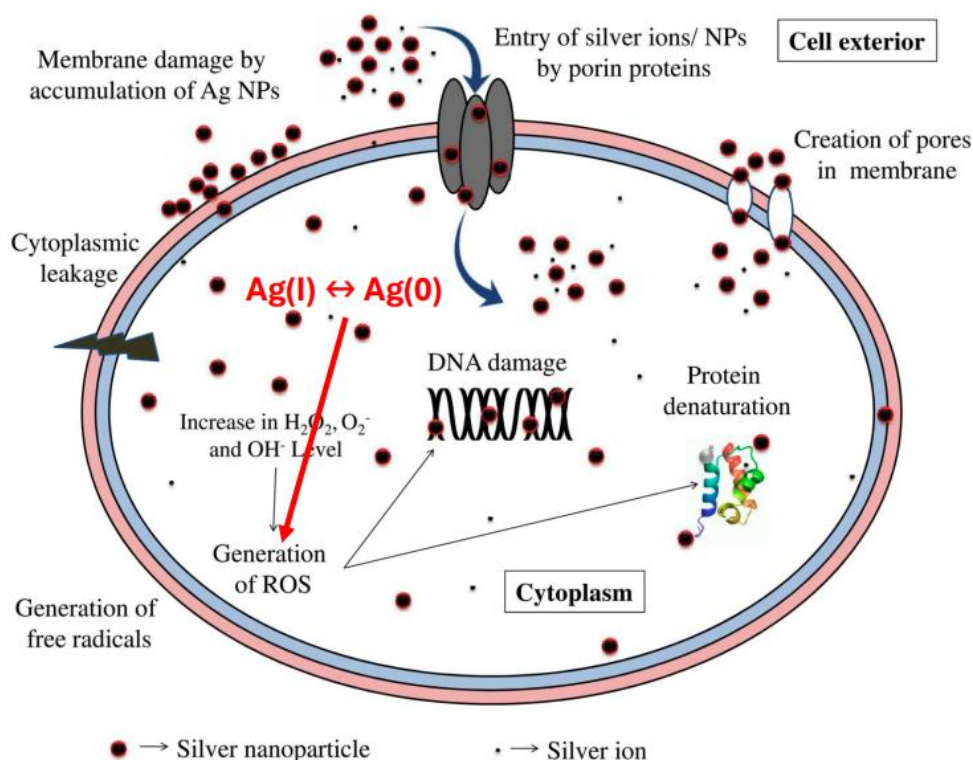


Рисунок 8. Предполагаемый механизм бактерицидного действия AgNPs [22].

Суммируя приведенные результаты, можно заключить, что, независимо от способа введения, хронические обработки млекопитающих высокими дозами AgNPs могут быть токсичными. Дополнительно, у пациентов с нарушенным выведением меди из организма, проводящих продолжительное время в госпиталях, в которых уборку производят с использованием AgNPs, в печени накапливается серебро в количестве 30-кратно превышающим фон [7]. Продемонстрирована принципиальная возможность встраивания ионов серебра в цинковые пальцы, функциональные модули, участвующие в белок-белковых, белок-ДНК, белок-РНК взаимодействиях [207].

2.4.2. Механизм интервенции серебра в метаболизм меди и использование AgNPs для управления статусом меди

Благодаря своему сходству с медью Cu(I), ионы Ag(I) легко узнают в медьтранспортных белках сайты связывания для Cu(I) и используют ТСМ для собственного транспорта по маршрутам меди [28, 194]. Поэтому абиогенные Ag(I)

могут вмешиваться в метаболизм меди. В представленной работе AgNPs использованы в качестве регуляторов биодоступной меди. Этот экспериментальный подход основан на результатах изучения влияния серебра на метаболизм меди.

2.2.1.1. Влияние AgNPs на показатели статуса меди

Сведения об интервенции серебра в метаболизм меди млекопитающих *in vivo*, механизмах его включения в купроэнзимы, последствиях, вызванных этим, и перспективах использования для управления доступности биоценной меди различным метаболическим процессам можно суммировать в следующих положениях.

Положение 1. Введение ионное серебро лабораторным грызунам приводят к падению оксидазной активности ЦП почти до нуля и пропорциональному снижению концентрации меди, ассоциированной с ЦП [245]. Эффект наступает через 5–6 ежедневных внутрибрюшинных введений [158]. В течение этого времени серебро аккумулируется преимущественно в печени и в меньшей степени в почках, легких и в селезенке. Мозг, белая жировая ткань, семенники, мышцы практически не накапливают серебро. У лабораторных грызунов, в печени которых серебро накапливалось в результате хронических обработок серебром, в крови сохранялось фоновое содержание АЛТ и АСТ, маркеров функции печени. К тому же концентрация меди в этих органах не меняется [48, 198]. У животных поведение, аппетит, физиологические функции не изменяются. Однократное введение солей меди или отмена инъекций серебра приводят соответственно к форсированному (через 10 часов) или через двое суток восстановлению показателей статуса меди [100]. Серебро перемещается в организме строго по маршрутам меди, оно выводится через желчь и при хронической обработке появляется в моче [198].

Положение 2. Препараты ЦП, выделенные из крови животных, хронически получавших серебро, состоят из ЦП с низкой оксидазной и феррооксидазной активностями и небольшой порции холо-ЦП. ЦП, потерявший энзиматическую активность, содержит 1–3 атома серебра на молекулу, пространственная укладка

которой, по данным кругового дихроизма и дифференциальной сканирующей калориметрии, соответствует расплавленной глобуле [32].

Положение 3. У Ag-грызунов на фоне почти нулевых величин концентрации оксидазного ЦП, концентрация полипептидов ЦП в крови и мембранах Гольджи, а также относительный уровень ЦП-мРНК в печени не снижаются [32, 158, 189]. Таким образом, падение оксидазной и ферроксидазной активности ЦП, обусловлено только снижением количества атомов меди, ассоциированной с ним (Рис. 9). Включение атомов серебра в активные центры купроэнзимов происходит только в том случае, если соответствующий Cu(I)-шаперон связывает Ag(I), а координационная сфера купроэнзима содержит остатки Cys. Этим требованиям соответствуют только мультимедные голубые оксидазы [194]. Так, ATOX1 и ATR7A/B, обеспечивающие перенос Cu(I) в люмен аппарата Гольджи, также связывают и передают ионы Ag(I). В активные центры мультимедных оксидаз входят остатки Cys. ATR7A/B встраивают медь в активные центры всех секреторных купроэнзимов. Однако каталитические центры других секреторных купроэнзимов млекопитающих не содержат остатков Cys. К тому же Cu(I)-шаперон COX17, доставляющий Cu^{1+} в митохондриальную цепочку переносчиков меди для ЦЦО, не связывает Ag(I).

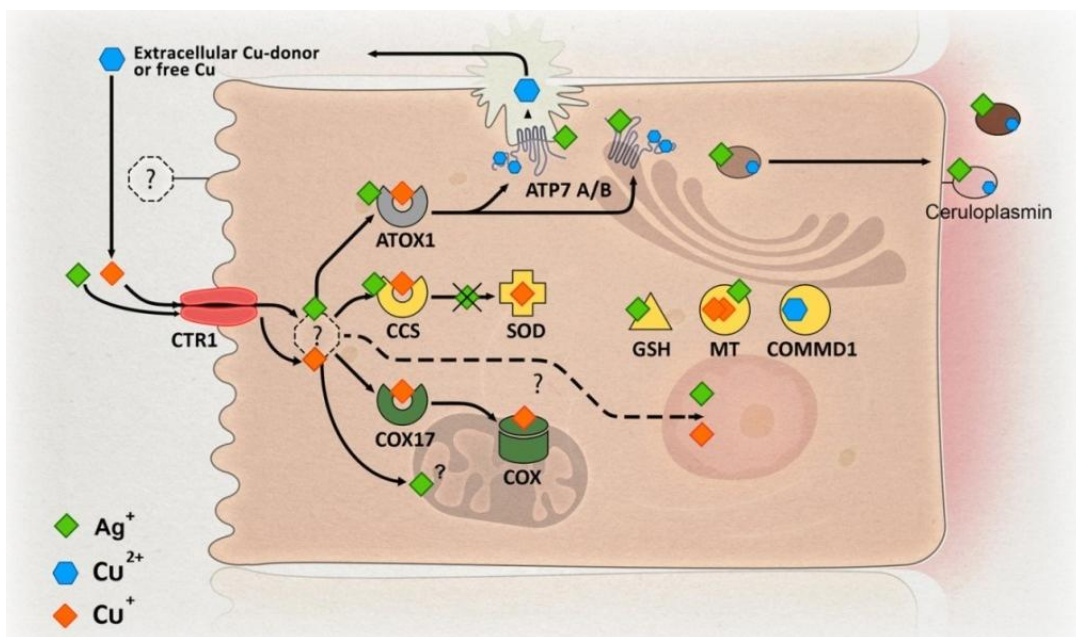


Рисунок 9. Схема переноса серебра в гепатоците. [32]

Таким образом, обработка млекопитающих субтоксическими концентрациями AgNPs уже через неделю приводит полному исчезновению холо-ЦП. При этом активность внутриклеточных и других секреторных купроэнзимов, как и концентрация меди в различных органах не изменяются. Через неделю после отмены инъекций AgNPs показатели статуса меди восстанавливаются, концентрация серебра в кровотоке резко снижается выводится из организма через желчь окончательно через 2 недели. Приведенные данные позволяют считать AgNPs быстродействующим в субтоксических концентрациях хелатором меди, не влияющим на клеточный метаболизм меди, не вызывающим побочные действия и легко удаляемый из организма.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Материалы, использованные в работе

3.1.1. Синтез наночастиц серебра (*AgNPs, Silver nanoparticles*)

AgNPs были произведены химическим способом путем восстановления нитрата серебра с использованием гидразингидрата в присутствии олеата калия в качестве стабилизатора на базе Университета ИТМО (Санкт-Петербург, РФ). Реагенты были приобретены в компании “Реахим” (Московская область, Россия). Размер наночастиц контролировали путем изменения концентраций нитрата серебра и олеата калия в реакционном объеме.

3.1.2. Физико-химическая характеристика *AgNPs*

Характеристика произведенных наночастиц была проведена на базе Центра коллективного пользования РНФ в Физико-техническом институте им. А.Ф. Иоффе РАН. Кристаллическая природа AgNPs была установлена методом оптической спектроскопии в УФ- и видимой области спектра с помощью прибора Shimadzu UV 1800 (Симадзу, Киото, Япония). Размер и форму AgNPs оценивали методами просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с использованием микроскопа Jeol JEM-2100F (Jeol, Токио, Япония) и лазерной дифрактометрии (Shimadzu, Киото, Япония). Элементный состав водного раствора AgNPs осуществлен с помощью метода энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (Симадзу, Киото, Япония). В качестве сравнения использовали данные элементного состава подложки. Рентгеновские спектры изготовленных AgNPs записаны на модуле INCA (Oxford Instruments, Bristol, UK), прикрепленном к ТЕМ (Jeol JEM-2100F). Концентрация серебра была определена нами методом атомно-абсорбционной спектрометрии (ААС) (спектрометр ZEEnit 650P, Analytik Jena, Германия). Так как препараты AgNPs могут содержать свободные ионы серебра, которые для различных организмов токсичнее, чем наночастицы, загрязнение ими полученного препарата AgNPs было оценено следующим способом. Раствор AgNPs центрифугировали при $30000\times g$ в течение 1, 2, 3 и 4 часов. Через указанные интервалы времени отбирали аликвоты из надосадочной жидкости и определяли в

них концентрацию серебра. После 2-часового центрифугирования в надосадочной жидкости присутствие ионов серебра не обнаруживали.

3.2. Биообъекты использованные в работе

В работе использованы штаммы вируса гриппа A(H1N1)pdm09 (ВГА), циркулировавшие в 2009-2020 гг. (таблица 1) – 21 штамм – и 3 контрольных штамма ВГА: A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) как модельный патогенный для мышей вирус, A/New Caledonia/20/99 (H1N1) как термоустойчивый вирус, и A/Florida/3/06 (H1N1) как термочувствительный вирус (таблица 1).

Таблица 1. Список штаммов ВГА, использованных при отборе модельного штамма.

A(H1N1)pdm09		
Название штамма	Аббревиатура	Источник
A/ C ALIFORNIA/07/2009	CA	¹ CDC ID 2009712112
A/ B olivia/559/2013	BO	CDC ID 2013760341
A/ M ississippi/10/2013	MS	CDC ID 2014700252
A/ N ew H ampshire/04/2013	NH	CDC ID 2013845913
A/ S outh A frica/3626/2013	SA	CDC ID 2014701384
A/ F lorida/62/2014	FL	CDC ID 3000097732
A/ L aos/1187/2014	LS	CDC ID 3000095267
A/ N ew Y ork/61/2015	NY	CDC ID 3000412528
A/ S lovenia/2903/2015	SL	² NIBSC lot 41730
A/ B angladesh/3002/2015	BN	CDC ID 3000411636
A/ N ew c astle/67/2017	NC	WHO-CC ID 322513509
A/ S outh A ustralia/272/2017	SS	WHO-CC ID 17-62350735
A/ N ew J ersey/13/2018	NJ	CDC ID 3026016623
A/ D arwin/123/2018	DN	WHO-CC ID 10010145
A/ B risbane/02/2018	BR	³ WHO-CC ID SS18S304
A/ I owa/59/2018	W8	CDC ID 3026018252
A/ I owa/12/2019	W9	CDC ID 3026019744
A/ V ictoria/2570/2019	VC	WHO-CC ID 10033413

A/ G uangdong- M aonan/SWL1536/2019	GM	NIBSC code 19/294
A/ A rkansas/08/2020	AR	CDC ID 3026055197
A/ I ndiana/02/2020	IN	CDC ID 3026055186
Контрольные вирусы		
A/ P uerto R ico/ 8 /34 (H1N1)	PR8	⁵ ATCC ID VR-1469
A/New Caledonia/20/99 (H1N1)	<i>non-ts 1</i>	NIBSC code 07/226
A/Florida/3/06 (H1N1)	<i>Ts1</i>	ATCC ID VR-1893

Примечания: ¹CDC: Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, the US. ²NIBSC: the National Institute for Biological Standards and Control, Hertfordshire, UK. ³WHO-CC: World Health Organization Collaborating Centre for Reference & Research on Influenza, Melbourne, Australia. ⁴Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia. ⁵ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, VA, the US. В названиях штаммов жирным шрифтом выделены буквы и цифры, использованные в сокращенных названиях штаммов.

Для размножения ВГА использовали 10–11-дневные развивающиеся куриные эмбрионы (птицефабрика «Синявино», Кировский район, Ленинградская область, РФ). Для изучения гриппозной инфекции *in vivo* использовали 8–12-недельных самок мышей линии СВА, весом 18–22 г (питомник “Рапполово”, Ленинградская область, РФ). Животных содержали в поликарбонатных клетках с древесной стружкой при контролируемой температуре (23–25 °C), цикле свет-темнота 12:12 часов, влажности 60%, при свободном доступе к пище и воде. Все манипуляции с вирусом гриппа проводили в боксе биобезопасности (БББ) II класса лаборатории уровня биобезопасности 2 (BSL-2). Работа с животными проводилась в соответствии с протоколом № 1/20 от 27 февраля 2020 года, одобренного локальным этическим комитетом ИЭМ, Санкт-Петербург, Россия.

3.3. Методы, использованные при выполнении работы

3.3.1. Классические вирусологические методы

3.3.1.1. Размножение ВГА в куриных эмбрионах.

Куриные эмбрионы заражали 200 мкл содержащего ВГА фосфатно-солевого буфера (PBS), содержащих ВГА, и инкубировали в течение 48 часов при 32 °C. Исходный вируссодержащий биологический материал получали из куриных

эмбрионов, содержащих $3 \log_{10}$ инфекционной дозы для 50% куриных эмбрионов (ЭИД₅₀/мл) и хранили в аликвотах при -80 °C.

3.3.1.2. Определение чувствительности репродукции вируса гриппа к повышенной и пониженной температуре инкубации (ts/non-ts и ca/non-ca фенотипы)

Способность ВГА расти при оптимальных (32 °C), низких (26 °C, холодадаптированный вирус, *ca*-фенотип) и повышенных (40 °C, температурочувствительный вирус, *ts*-фенотип) температурах определяли путем титрования на 10–11-дневных куриных эмбрионах при соответствующих температурах инкубации. Расчет $\log_{10}$ ЭИД₅₀/мл был основан на методе Reed и Muench [26]. Титры вирусов представлены в процентах, при этом титр при 32 °C для каждого вируса принимался за 100%, а проценты титра при 40 °C и 25 °C рассчитывались относительно титра при 32 °C (расчет относительного процента). Вирусы с *non-ts* фенотипом или *ca* фенотипом имеют относительный титр выше 60%, тогда как вирусы с *ts*-фенотипом или *non-ca* фенотипом имеют относительный титр ниже 40%. Вирусы, не имеющие четкого фенотипа, распределяются в интервале от 40% до 60% и представляет собой промежуточные варианты.

3.3.1.3. Определение термостабильности гемагглютиниона (НА)

Для измерения термостабильности НА инфекционную аллантоисную жидкость разводили 1:5 PBS. Вирусы инкубировали в термоблоке для инактивации в течение 20 мин при температурах от 37 до 70 °C, после чего проводили анализ гемагглютинации с использованием 1,0% куриных эритроцитов. Параллельно контрольные образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Считали, что НА имеет низкую стабильность, если белок теряет свою гемагглютинирующую активность при температуре ниже 58 °C. При сохранении своей активности при температуре выше 58 °C НА считали стабильным.

3.3.1.4. Определение острой токсичности ВГА для мыше.

Мышей, не менее 10 особей в группе, под легким эфирным наркозом интраназально вводили им 75–100 мкл свежей неразведенной инфекционной аллантоисной жидкости (ИАЖ). В течение первых 6 дней после заражения ежедневно определяли число погибших животных. Штаммы, у которых летальность была выше 50%, считали высокотоксичными. Если вирус вызывал летальность 50% или ниже, считали его малотоксичным. Вирусы, не вызывавшие летальности, считались нетоксичными.

3.3.1.5. Определение патогенности ВГА для мышей

Для каждого тестируемого вируса готовили 10-кратные разведения исходной ИАЖ в PBS. Мышей (10 особей в группе) анестезировали диэтиловым эфиром, интраназально вводили по 50 мкл соответствующих разведений вируса, поровну разделенных на каждую ноздрю. Летальность мышей от пневмонии наблюдали в течение 14 дней после заражения. ЛД₅₀ рассчитывали по методу Reed и Muench [26] и выражали как $\log_{10}$ ЭИД₅₀/мл, необходимый для получения 1 ЛД₅₀. Вирусы с $1 \text{ ЛД}_{50} \leq 5 \log_{10} \text{ ЭИД}_{50}/\text{мл}$ считались высокопатогенными, тогда как вирусы с $1 \text{ ЛД}_{50} > 5 \log_{10} \text{ ЭИД}_{50}/\text{мл}$ считались низко патогенными, а вирусы, не вызывавшие гибель мышей – апатогенным.

3.3.1.6. Репликация ВГА в легких мышей

Способности вируса размножаться в нижних дыхательных путях измеряли в образцах легких, собранных на 3-й день после заражения. Гомогенаты тканей готовили с использованием бисерной мельницы TissueLyser LT (QIAGEN, Германия) в 1,0 мл PBS, содержащего смесь антибиотика и антимикотика (Invitrogen, Великобритания); осветленные центрифугированием при 4 °C 8000g в течение 5 мин надосадочные жидкости титровали в куриных эмбрионах при температуре 32 °C.

3.3.1.7. Определение МИД₅₀ (50%-ная инфицирующая доза для мышей).

Для определения МИД₅₀ мышей заражали 10-кратными разведениями ИАЖ, содержащими тестируемые вирусы. Каждая группа состояла из 5 мышей. Титр вируса измеряли в образцах легких, собранных на 3-й день после заражения как описано выше (см. 3.3.1.6). Для определения инфекционного титра вируса эмбрионы были инфицированы осветленными надосадочными жидкостями.

3.3.2. Методы, использованные для изучения распределения AgNPs в организме мышей

3.3.2.1. Тестирование способов введения AgNPs мышам

Для выбора метода введения, мышам (по пять особей в каждой группе) вводили AgNPs внутрибрюшинно, внутривенно, интраназально и перорально. AgNPs суспендировали в физиологическом растворе и вводили мышам в виде однократных ежедневных инъекций в дозе ~2 мг серебра на кг массы тела в течение 5 дней. На 5-й день, через четыре часа после последней инъекции, собирали сыворотку крови и образцы печени.

3.3.2.2. Динамика распределения серебра наночастиц в крови, печени и легких (эксперименты пульс-чейз типа).

Мышам внутрибрюшинно вводили AgNPs в дозе 2 мг/кг массы тела. Образцы периферической крови, печени и легких отбирали с различными интервалами, начиная от 5 мин до 24 ч. В каждой временной точке было обследовано не менее трех животных. Концентрацию серебра измеряли в сыворотке крови, образцах ткани печени и легких. В сыворотке крови также измеряли концентрацию меди, оксидазную активность ЦП, как описано в ниже (см. раздел 000), и относительное содержание иммунореактивного ЦП.

3.3.2.3. Динамика распределения серебра наночастиц в крови, печени и легких (после многократного введения)

Мышам внутрибрюшинно вводили AgNPs в дозе 2 мг/кг массы тела ежедневно в течение 7 дней. Каждый день отбирали образцы периферической

крови, печени и легких у трех мышей спустя 4 часа после инъекции AgNPs. В сыворотке крови и в образцах ткани печени и легких проводили анализы как описано выше (раздел 3.3.2.2.)

3.3.3. Экспериментальные и биокомпьютерные методы исследования нуклеиновых кислот

3.3.3.1. Выделение тотальной РНК

Образцы тканей гомогенизировали с реагентом RiZol (Диаэм, Россия) с помощью дезинтегратора T10 basic ULTRA-TURRAX (IKA, Германия), после чего добавляли к ним хлороформ, осторожно встряхивали и центрифугировали для разделения фаз. Из водной фазы осаждали РНК с помощью изопропанола, а затем осадок промывали в 75% этаноле. Очищенную РНК растворяли в деионизированной воде, свободной от нуклеаз (Евроген, Россия). РНК из ИАЖ была выделена с использованием набора Ribo-prep (АмплиСенс, Москва, Россия). Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США). Чистота образцов РНК оценивалась по отношениям D260/D280 и D260/D230.

3.3.3.2. Секвенирование вирусного генома

Вирусный геном был секвенирован с помощью анализатора Applied Biosystems 3130xl с использованием набора для циклического секвенирования BigDye™ Terminator v3.1 (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Праймеры, используемые для ОТ-ПЦР и последующего секвенирования, приведены в приложении 1. Определение однонуклеотидного полиморфизма методом пиросеквенирования проводили с помощью системы генетического анализа PyroMark Q24 (QIAGEN, MD, США). Для реакции пиросеквенирования использовали олигонуклеотид ACGGGCAATCTCCAAACA.

3.3.3.3. Определение активности генов на уровне транскрипции

Определение активности генов осуществляли методом ПЦР в реальном времени. кДНК синтезировали методом обратной транскрипции с помощью набора

RevertAid RT Kit (Thermo Scientific, США) по инструкции производителя. В пробы добавляли по 1 мкг тотальной РНК. Полученные образцы кДНК анализировали методом ПЦР в реальном времени (qPCR). При подготовке проб использовали реакционную смесь qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия), праймеры в концентрации 0,3 пМ (Syntol, Россия), представленные в таблице 2, и деионизированную воду, свободную от нуклеаз (Евроген, Россия). В качестве референсного гена использовали β -актин. Анализ проводили с помощью CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США).

Таблица 2. Последовательности праймеров, использованных для определения концентрации зрелых транскрипционных продуктов.

Ген	Последовательность F праймеров	Последовательность R праймеров
<i>β-actin</i>	GATCAAGATCATTGCTCCTCCTGA	ACGCAGCTCAGTAACAGTCC
<i>ATP7A</i>	CAGATGTAGCCATTGAAGCAGC	CAGGAAAACTCCAGCAGCGAT
<i>ATP7B</i>	CACGAGATGAAAGGACAGACGG	TTGATGCCAACCTGAGTAGCAA
<i>CTR1</i>	ATGAACCACACGGACGACAA	CCAGCCATTTCTCCAGGTGTAT
<i>Cp</i>	TTCCCCAAACACCTGGAACC	GACTTAGTCTCTTGTTCTACTGGT
<i>GPI-Cp</i>	TTCCCCAAACACCTGGAACC	CCTGTAACTCTGAGATGATACTTGT
<i>SOD1</i>	GAAGCATGGCGATGAAAGCG	GCACTGGTACAGCCTTGTGTA
<i>Mt1</i>	ACCTCCTGCAAGAAGAGCTG	TCACATCAGGCACAGCACG
<i>Prnp</i>	TACGACGGGAGAAGATCCAG	ATCCCACGATCAGGAAGATG
<i>ATOX</i>	CAACATTGACCTGCCCAACAAG	CTGTTTTGTTGAGGGTTGCCAG
<i>CCS</i>	TGGTCCGCTTCCTACAGCTA	CAGCTATTGCAGTCCCTCGT

3.3.3.3. Биоинформатический анализ вирусного генома

Для выравнивания последовательностей был использован метод множественного выравнивания (MUSCLE algorithm), а для построения филогенетических деревьев – (PHYLP Neighbor-Joining method). Оба метода были выполнены с использованием программы Unipro UGENE v1.12.1 [34], все белковые последовательности были получены с платформы GISAID.

Для проверки уникальности мутаций в полимеразном комплексе вируса SA использовали метод множественного выравнивания. Анализируемые вирусы представлены в приложении (Табл. 1).

3.3.4. Определение относительного содержания иммунореактивных полипептидов методом иммуноблотинга

Разделение белков осуществляли методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях на установке Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, США). Содержание белка в образцах составляло 30 мкг на дорожку. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (размер пор 0,45 мкм, Bio-Rad, США) методом «мокрого» переноса. Перенос осуществлялся в трис-глициновом буфере при постоянной силе тока 350 мА в течение 1 часа, качество переноса контролировали окрашиванием мембраны раствором Ponceau S. Интенсивность зон с одинаковой молекулярной массой, окрашенных на общий белок Ponceau S, также использовали в качестве референсных. После переноса мембрану блокировали в течение часа 5% раствором обезжиренного молока, приготовленным на PBST (PBS, 0.1% Tween-20). Затем мембрану инкубировали в течение ночи при 4 °С с соответствующими первичными антителами, специфичными к анализируемому белку (Abcam, Великобритания). После инкубации мембрану отмывали в PBST 5 раз по 5 минут, после чего добавляли вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, в концентрации 1:2000 и инкубировали в течение часа. Затем мембрану промывали в PBST по той же схеме. Хемилюминесцентную детекцию осуществляли с помощью субстрата Clarity™ Western ECL (Bio-Rad, США) и гель-документирующей системы ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad, США). Результаты анализировали с помощью программы ImageJ.

3.3.5. Выделение субклеточных фракций

Образцы тканей гомогенизировали в 0,25 М сахарозном буфере (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTT) с помощью дезинтегратора T 10 basic ULTRA-TURRAX (IKA, Германия). Субклеточные фракции из гомогената изолировали методом дифференциального центрифугирования (Allegra X-30R Centrifuge, Beckman Coulter, США). Гомогенаты центрифугировали при 1000xg в течение 10 минут. Осадок, содержащий фрагменты плазматической мембраны и

ядра, инкубировали в лизирующем буфере (20 mM Tris, pH8, 150 mM NaCl, 0,5% NP-40, 1% Triton X-100, 1mM EDTA, 10% глицерол) в течение 30 мин и затем центрифугировали 10 мин при 2000xg. Надосадок и просветляли центрифугированием 1 час при 25000xg и использовали как фракцию белков плазматической мембраны. Супернатант, полученный после осаждения ядер и фрагментов плазматической мембраны, центрифугировали 1 час при 29000xg, осадок отбрасывали, а супернатант использовали как цитозольную фракцию. Все процедуры проводили при температуре 4 °C.

3.3.6. Определение каталитической активности ферментов

3.3.6.1. Оксидазную активность ЦП

Оксидазную активность ЦП измеряли методом прямого окрашивания в геле с помощью абиогенного субстрата о-дианизидина: образцы сыворотки (2 мкл) и плазматических мембран (180 мкг общего белка) электрофоретически разделяли в 8% ПААГ в неденатурирующих условиях. Гели окрашивали раствором о-дианизидина (Thermo Scientific, США) для выявления оксидазной активности ЦП и его GPI-связанной формы [25].

Оксидазную активность ЦП также измеряли колориметрическим методом, используя *пара*-фенилендиамин: к 200 мкл раствора 0,2% *пара*-фенилендиамин дигидрохлорида, приготовленного на 0,4 М Na-ацетатном буфере, pH 5.5, добавляли по 10 мкл препарата ЦП и инкубировали пробы 1 час при температуре 37 °C. Реакцию останавливали, внося в лунки по 40 мкл 0,5% азида натрия. Оптическая плотность раствора была измерена при 530 нм с помощью планшетного спектрофотометра CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия). Концентрация белка была оценена по стандартной кривой, построенной по калибровочным растворам ЦП с известной концентрацией.

3.3.6.2. Определение активности СОД1

Активность СОД1 оценивали прямым тестированием в геле. Цитозольную фракцию разделяли электрофорезом в 12% ПААГ в неденатурирующих условиях,

затем гель инкубировали 15 мин в 0,1% растворе Nitroblue tetrazolium (NBT), приготовленном на 100 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7.0. После инкубации гель промывали в воде и помещали на 15 мин в 0,1% раствор тетраметилэтилендиамина (TEMED), приготовленном на 100 мМ калий-фосфатном буфере,. По истечении времени в раствор добавляли 0,01% рибофлавина и инкубировали 15 минут. После инкубации гель промывали в воде и облучали УФ в течение 5–10 минут до появления обесцвеченных зон (УФ-транс-иллюминатор, UVP, США)

3.3.6.3. Определение активности аланинаминотрансминазы (АЛТ) и аспаратаминотрансферазы (АСТ)

Для оценки функционального состояния печени у мышей измеряли сывороточную активность АЛТ и АСТ с помощью наборов АЛТ-РФ и АСТ-РФ («Ольвекс Диагностикум», Санкт-Петербург, Россия) согласно инструкции производителя.

3.3.7. Получение электрофоретически чистых препаратов ЦП

Холо-ЦП и Ag-ЦП (ЦП, содержащий серебро в активном центре) были изолированы соответственно из сыворотки интактных мышей и мышей, которым вводили AgNPs в течение пяти дней в концентрации 2 мг/кг масса тела. Для выделения ЦП были использованы три метода хроматографии: ионообменная, аффинная и эксклюзионная (гель-фильтрация). Фракции, содержащие холо-ЦП, идентифицировали путем определения оксидазной активности, по соотношению $A_{610/280}$ и методом иммуноблотинга. Фракции, содержащие Ag-ЦП, идентифицировали методом иммуноблотинга. Для проведения ионообменной хроматографии колонку заполняли ионообменной средой Bio-Rad UNOsphere Q, обладающей сильным анионообменным действием, промывали среду с использованием проточного буфера 10 мМ Hepes-NaOH (pH 7,4). Одновременно сыворотку разбавляли в 4 раза холодной водой дистиллированной H_2O и наносили на колонку. Колонку промывали раствором 10 мМ Hepes-NaOH (pH 7,4). Фракции белков элюировали с помощью градиента NaCl, приготовленного на 10 мМ Hepes-NaOH буфере (pH 7,4), начиная с 20 мМ и заканчивая 500 мМ, со скоростью 2

мл/мин при общем объеме 60 мл. Для аффинной хроматографии в качестве твердой фазы использовали неомицин-агарозную смолу. Колонку промывали 4 М NaCl, затем 10 mM Hepes-NaOH (pH 7,4). Фракции, содержащие после анионообменной хроматографии ЦП, объединяли, разбавляли охлажденным 10 mM раствором Hepes-NaOH (pH 7,4) в отношении 1:10 и наносили на колонку, которую затем промывали холодным 10 mM раствором Hepes-NaOH (pH 7,4) до тех пор, пока поглощение элюированной жидкости при 280 нм не становилось ниже 0,05. Элюцию проводили градиентом NaCl, как описано для ионообменной хроматографии. Фракции, содержащие ЦП, были собраны, концентрированы и обессолены с помощью трубки Spin-X 100 000 MWCO в соответствии с инструкциями производителя. Эксклюзионную хроматографию проводили с использованием TOYOPEARL HW-55 в качестве твердой фазы. Колонку промывали буфером (100 mM NaCl и 10 mM Hepes-NaOH (pH 7,4)), на колонку наносили концентрированный препарат ЦП, и проводили хроматографию в буфере (100 mM NaCl и 10 mM Hepes-NaOH (pH 7,4)) со скоростью 2 мл/мин при общем объеме 120 мл. Фракции, содержащие ЦП, собирали, концентрировали и обессоливали.

3.3.8. Выделение лейкоцитарной фракции

Образцы крови были взяты у интактных мышей и смешаны с EDTA в концентрации 40 мг/мл для ингибирования свертывания крови. После этого образец центрифугировали со скоростью 300xg в течение 8 минут без торможения при комнатной температуре. Фракцию жидкости над эритроцитами собирали и снова центрифугировали. Осадок лейкоцитов и оставшиеся эритроциты ресуспендировали в охлажденном гипотоническом растворе 0,2 % NaCl для гемолиза эритроцитов, через 30 сек добавляли 1,6 % NaCl для восстановления осмотического давления. После центрифугирования, осадок лейкоцитов ресуспендировали в растворе PBS с D-глюкозой в концентрации 2 мг/мл. Количество клеток подсчитывали в Камере Горяева.

3.3.9. Исследование апоптоза нейтрофилов

Для исследования апоптоза нейтрофилов использовали лейкоцитарную фракцию, изолированную из крови интактных мышей. Аликвоты лейкоцитов (5000 клеток в мкл) смешивали с различными дозами высокоочищенных препаратов холо-ЦП или Ag-ЦП до конечной концентрации 0,6 или 1,5 мг/мл. После добавления ЦП клетки инкубировали в течение 1 и 2 часов. Наличие апоптоза нейтрофилов оценивали по присутствию фрагментов апоптотической лестницы, выявляемой при электрофорезе препаратов ДНК (750 нг/лунку) в 2% агарозном геле в течение 1 часа при 40 мА [45]. Результаты регистрировали с помощью системы ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad, США).

ДНК изолировали из клеток, лизированных в буфере, содержащем 0,05 М Tris-HCl, pH 8,0, 0,01 М EDTA, 0,1 М NaCl, 1% SDS, и 90 мкг/мл протеиназу К при 55 °С в течение часа, затем добавляли раствор 6 М NaCl до конечной концентрации 2 М. Денатурированные белки убирали центрифугированием. Из супернатанта осаждали ДНК раствором 50 % изопропанола, осадок промывали 75% этанолом. Высушенный осадок ДНК растворяли в деионизированной воде, свободной от нуклеаз (Евроген, Россия). Концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США). Чистота образцов ДНК оценивалась по соотношениям оптических плотностей D_{260}/D_{280} и D_{260}/D_{230} .

3.3.10. Измерение концентрации IL-6 и IL-2

Концентрацию IL-6 измеряли с помощью набора для ИФА RayBio® Mouse IL-6 в соответствии с инструкциями производителя.

Для измерения уровня IL-2 использовали 96-луночный планшет с адгезивным слоем, антитела против IL-2 преинкубировали в нем в течение 24 часов при 4 °С. Планшет четыре раза отмывали PBST буфером, добавляли разбавленную в 2 раза испытуемую сыворотку и инкубировали 2,5 часа при комнатной температуре. После отмывки PBST добавляли биотинилированные антитела против мышиного IL-2 и инкубировали в течение часа, затем лунки промывали, добавляли стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена, и инкубировали час. После инкубации лунки промывали, добавляли раствор субстрата из 3,3,5,5'

тетраметилбензидина (ТМВ) и инкубировали в темноте в течение 30 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением серной кислоты и измеряли поглощение при длине волны 450 нм с помощью планшетного спектрофотометра CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия).

3.3.11. Измерение бактериальной нагрузки в легких мышей

Бактериальную нагрузку измеряли в образцах легких, собранных на 6-ой день после заражения вируса SA. Гомогенаты тканей готовили с использованием бисерной мельницы TissueLyser LT (QIAGEN, Германия) в 1,0 мл PBS, из каждой надосадочной жидкости готовили 10-кратные разведения с использованием PBS и высевали на колумбийский агар (Condalab, Испания) и агар Лурия-Бертани (ЛБ-агар) (Amresco, США), затем инкубировали 24 часа при температуре 37 °C. Титры бактерий в суспензии рассчитывали по формуле:

$$\text{КОЕ} = \frac{N \times D}{V}$$

Где:

- КОЕ — концентрация клеток в исходной суспензии (количество колониеобразующих единиц на мл),
- N — количество колоний, подсчитанных в посеве разведённого образца (количество колоний на чашке Петри),
- D — коэффициент разведения (для 10-кратного разведения, D=10),
- V — объём посеянной культуры данного разведения

Представители бактериальных клонов, которые выросли на питательных средах, были идентифицированы с помощью технологии MALDI-TOF на приборе Bactoscreen (Литех, Россия).

3.3.12. Определение концентрации белка

Концентрацию белка определяли с помощью колориметрического метода Бредфорда. Реагент готовили согласно стандартному протоколу: 100 мг Кумасси G-250 растворяли в 50 мл спирта, добавляли 100 мл ортофосфорной кислоты, доводили раствор до 1 Л водой. При построении стандартной кривой использовали препараты бычьего сывороточного альбумина. Образцы с реагентом смешивали в соотношении 1:30 в серологическом планшете, измерение поглощения проводили

на длине волны 585 нм с помощью планшетного спектрофотометра CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия).

3.3.13. Окрашивали ПААГ на общий белок

ПААГ окрашивали на общий белок 0.5% раствором Кумасси синим R-250 в 45% метаноле и 10% уксусной кислоты и промывали в воде при температуре 100 °C.

3.3.14. Измерение концентрации Cu и Ag

Концентрацию меди и серебра определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермическим распылением и зеемановской коррекцией неселективного поглощения на спектрофотометре ZEEnit 650 P производства Analytik Jena (Германия). Образцы взвешивали и растворяли в азотной кислоте. После полного растворения образца в азотной кислоте определяли концентрации металлов.

3.3.15. Статистическая обработка

Все статистические анализы были проведены в GraphPad Prism 8.0.1 [241]. Результаты летальности мышей были обработаны при помощи критерия Log-rank (Mantel-Cox). Статистическая обработка данных, полученных в экспериментах на вирусах, проводилась при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием апостериорного теста Тьюки для множественных сравнений, этот критерий так же был использован для обработки результатов с AgNPs. Данные, полученные из экспериментов с AgNPs, вводимых на фоне инфицирования вирусом, были проанализированы при помощи двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием апостериорного теста Тьюки для множественных сравнений. Отличие считали статистически значимым при значении p-value ниже 0,05.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Используемые в настоящее время адаптированные к мышам модельные вирусы, такие, как A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (PR8), B/Lee/40, A/Victoria/35/72 (H3N2) и A/Aichi/2/68 (H3N2), антигенно отличаются от циркулирующих в настоящее время вирусов. Однако ряд тестов (например, скрининг противовирусных препаратов) требует использования современных штаммов. Процесс адаптации занимает много времени и усилий и поскольку некоторые штаммы вируса гриппа H1N1pdm09 могут вызывать заболевание у мышей без предварительной адаптации [166], первая часть работы посвящена выбору модельного вируса гриппа H1N1pdm09 для лабораторных мышей. Таким образом, двадцать один штамм из H1N1pdm09 были проанализированы, на возможность использовать их в качестве модельных вирусов (таблица 1).

4.1 Поиск модельного штамма ВГА для заражения мышей

4.1.1 Изучение основных свойств кандидатных штаммов

Вирусы-кандидаты в модельные вирусы были тестированы на ряд основных биологических свойств, а именно на проявление *ts/non-ts* фенотипа, термостабильность НА, а также на патогенность и токсичность у мышей.

4.1.1.1. Определение *ts/non-ts* и *sa/non-sa* фенотипов тестируемых вирусов

Способность вируса к размножению при температуре инкубации, превышающей оптимальную (*non-ts* фенотип), является одной из важнейших фенотипических характеристик модельного штамма, поскольку вирусы *non-ts* фенотипа обладают способностью поражать нижние дыхательные пути, поскольку они могут размножаться при температуре выше 37 °С, что повышает их патогенность и позволяет им противостоять защитным факторам организма [11].

Титр изученных вирусов при оптимальной температуре 32 °С варьировал от 6,9 $\log_{10}$ ЭИД₅₀/мл (A/Iowa/12/2019) до 9,2 $\log_{10}$ ЭИД₅₀/мл (A/South Africa/3626/2013). Чтобы нормализовать это несоответствие, оптимальному значению титра было присвоено номинальное значение 100%. Затем для каждого

вируса титры при каждой температуре рассчитывали в процентах относительно этого номинального значения (relative % titer, сравнительный титр). Исследуемые H1N1pdm09 вирусы сохраняли *non-ts* фенотип с 2009 по 2015 год, когда появился первый *ts* штамм (9 – A/Slovenia/2903/2015), после чего *ts* фенотип появился еще у двух других штаммов (13 – A/New Jersey/13/2018 и 21 – A/Indiana/02/2020) в 2018 и 2020 годах соответственно (Рис. 10). Таким образом, 3 вируса из 21 имели четко выраженный *ts* фенотип (SL, NJ, и IN), тогда как остальные проявляли *non-ts* фенотип (Рис. 10) [51].

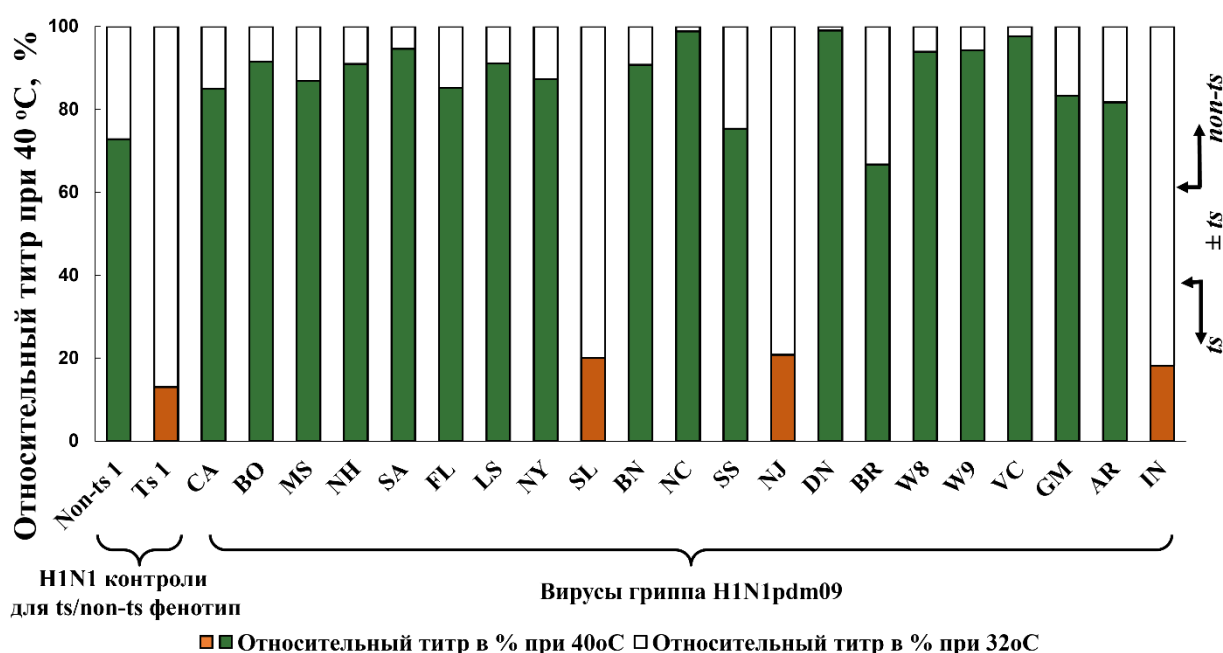


Рисунок 10. Гистограмма, демонстрирующая чувствительность размножения вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 к повышению температуры до 40 °C. Результаты выражены в процентном отношении титров вирусов при температуре 40 °C к титрам при температуре 32 °C (ось ординат). По оси абсцисс – название вирусов (см. Табл. 1). Обозначения: зеленый – вирусы с *non-ts* фенотипом, оранжевый – вирусы с *ts* фенотипом.

4.1.1.2. Стабильность гемагглютини́на (НА) тестируемых вирусов

Динамика снижения активности НА при повышении температуры от 25 °C до 70 °C показана на рисунке 11. Исследованные вирусы были разделены на две группы в зависимости от температурного порога их активности. Первая группа проявляла высокую стабильность НА (температурный порог активности НА 60–65 °C) (Рис. 11А), вторая группа – низкую стабильность НА (температурный порог активности НА 54–58 °C) (Рис. 11Б).

У НА вируса SA был зафиксирован самый высокий температурный порог активности, при котором он начал терять свою активность (65 °C) (Рис. 11А). Все вирусы, имеющие стабильный НА, также являются и *non-ts* вирусами [51].

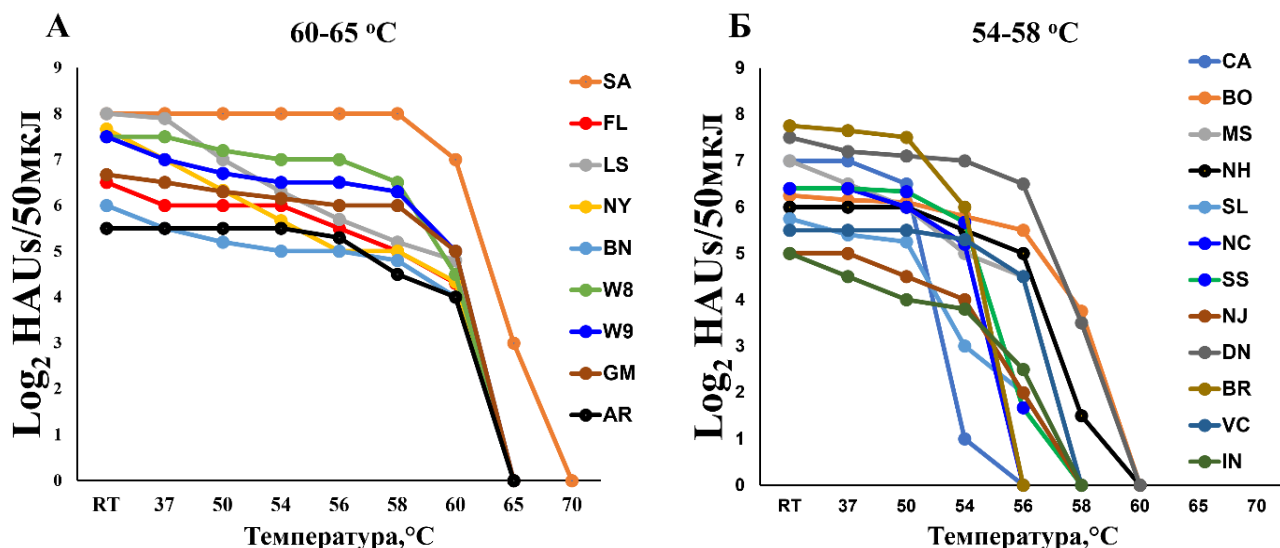


Рисунок 11. Динамика потери термостабильности НА вирусов A(H1N1)pdm09, циркулировавших в 2009-2020 гг. (А) Температурный порог активности НА составляет 60-65 °C (высокая термическая стабильность); (Б) Группа вирусов с низкой термостабильностью НА (54-58 °C). RT – комнатная температура, 25 °C. В вертикальных рядах: цветовые обозначения изученных вирусных штаммов (см. Табл. 1).

4.1.1.3. Летальность мышей от токсичных доз тестируемых вирусов

Исследуемые штаммы были сравнены по их способности вызывать гибель мышей от острого отека легких, известную как «вирусная токсичность» [250]. Патологоанатомическое исследование погибших мышей показало, что острый отек поражает все доли легкого (Рис. 12, А). Летальность мышей после заражения токсической дозой каждого из тестируемых вирусов наблюдали в течение 6 дней. Из 21 штамма ВГА десять (47,6%) были слаботоксичными, а одиннадцать (52,4%) – высокотоксичными (Рис. 12, Б). Все высокотоксичные вирусы, также являются *non-ts* [51].



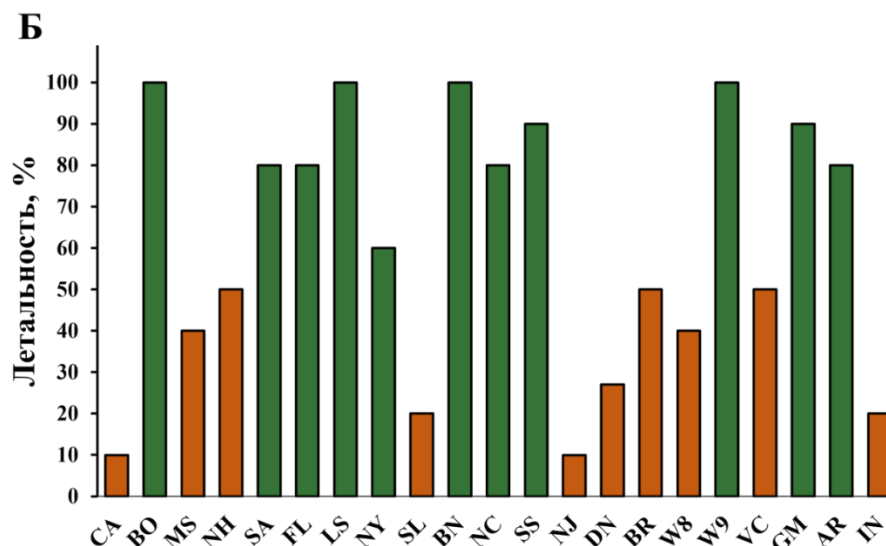


Рисунок 12. Токсичность тестируемых вирусов гриппа (H1N1)pdm09. (А) Макроморфологические изменения легких мышей на 4 день после заражения токсичной дозой (1); контрольные животные (2). (Б) Летальность мышей наблюдали в течение шести дней после заражения токсической дозы тестируемых вирусов. Обозначения: зеленый – вирусы с высокой токсичностью, оранжевый – вирусы с низкой токсичностью.

4.1.1.4. Определение летальной дозы тестируемых вирусов

Для определения смертельных доз мышей (по 10 в каждой группе) заражали 10-кратными разведениями тестируемых вирусов, летальность среди них наблюдали в течение 14 дней после заражения. Из 21 штамма ВГА только вирус SA является высокопатогенным так как его летальная доза составила $4.8 \log_{10}$ ЭИД₅₀/мл (Рис. 13). Пять штаммов (BO; NH; FL; LS; и BN) являются слабopatогенными, их летальные дозы превышают $5 \log_{10}$ ЭИД₅₀/мл. Остальные 15 штаммов оказались апатогенными (Рис. 13) [51].

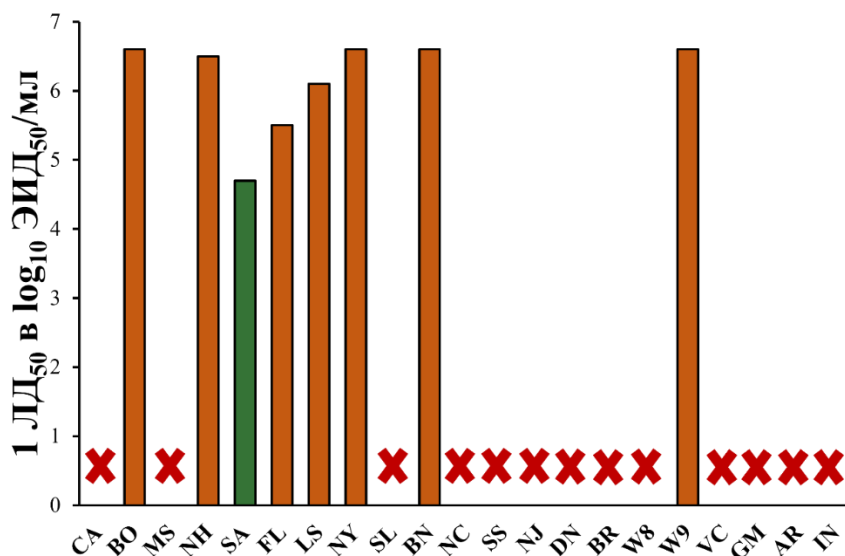


Рисунок 13. ЛД₅₀ тестируемых вирусов. Летальность мышей учитывали в течение 14 дней после заражения мышей 10-кратными разведениями тестируемых вирусов. Обозначения: зеленый – высокая патогенность; оранжевый – низкая патогенность; красный крест – отсутствие патогенности.

Полученные результаты иллюстрируют, что для того, чтобы вирус обладал такими свойствами, как токсичность или термостабильность гемагглютиниона, необходимо, но недостаточно, чтобы его можно было охарактеризовать как *non-ts* вирус. Наличие трех признаков (*non-ts* фенотип, токсичность, и термостабильный гемагглютинин) необходимо, но недостаточно для того, чтобы вирус стал патогенным для лабораторных животных (Рис. 14), что указывает на наличие еще некоторых свойств, которые также могут влиять на степень патогенности. Наиболее вероятными кандидатами на роль этих не установленных свойств, являются трансмиссивность и устойчивость к неспецифическим ингибиторам сывороток [51].

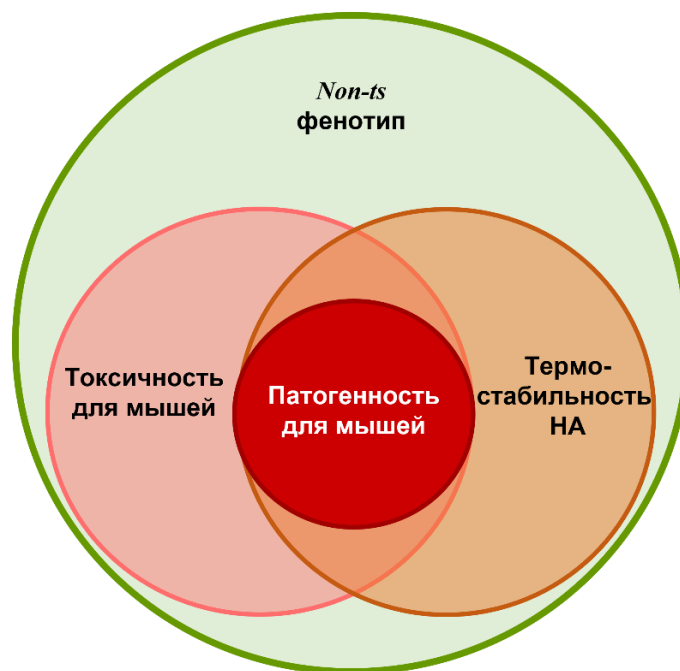


Рисунок 14. Корреляции четырех свойств вируса гриппа А (H1N1)pdm09.

4.1.1.5. Предполагаемая генетическая основа различий в биологических свойствах тестируемого вируса

Для понимания причины изменений в биологических свойствах ВГА были построены филогенетические древа всех 10 белков штаммов ВГА H1N1pdm09.

Четкой корреляции между патогенностью и первичной структурой их генов выявлено не было (Рис. 15, приведено древо НА в качестве примера) [51].

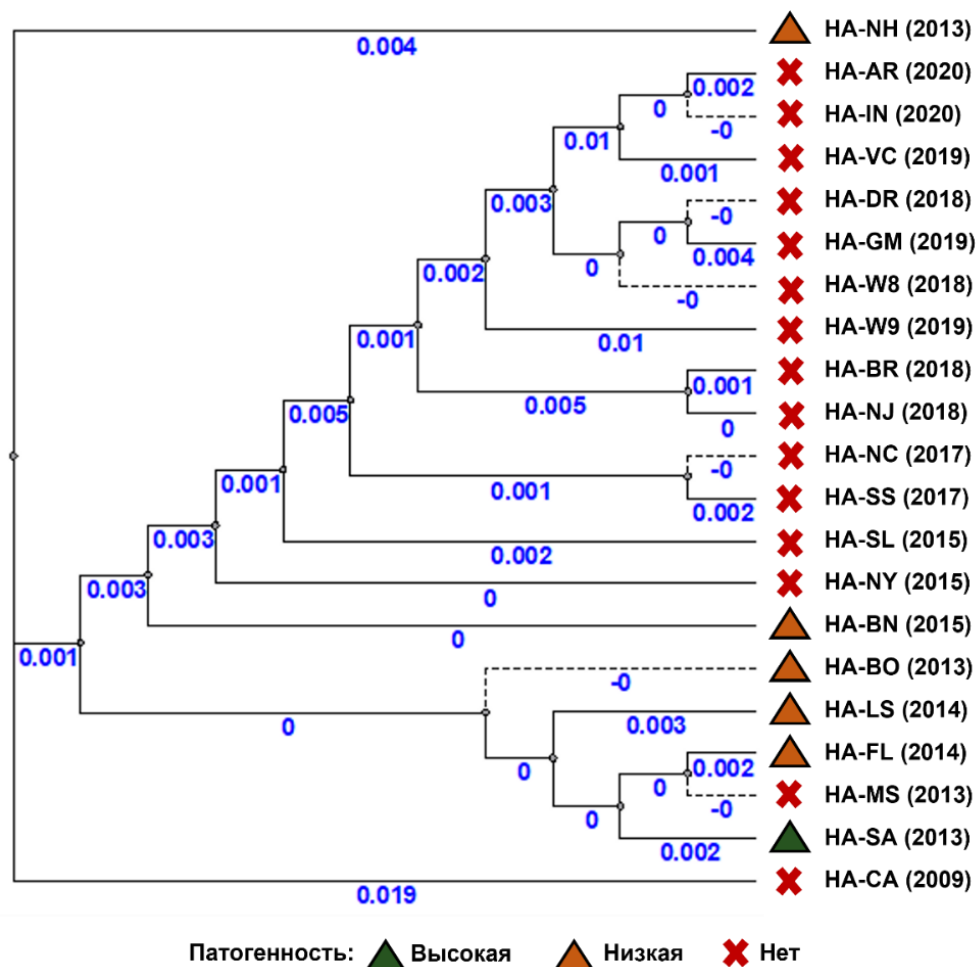


Рисунок 15. Филогенетическое древо НА рассмотренных штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09. Обозначения: зеленый треугольник – штамм с высокой патогенностью; оранжевый – штамм с низкой патогенностью; красный крест – апатогенный штамм.

Поскольку распределение вирусных белков по филогенетическим древам не дало четких объяснений вирусной патогенности, поиск природы патогенности был перенесен на анализ аминокислотных последовательностей. Поиск был направлен на выявление специфических замен в геноме патогенных штаммов. Было проведено выравнивание аминокислотной последовательности для всех вирусных белков 21 исследованного штамма ВГА. Замен, которые присутствуют у всех патогенных штаммов, но отсутствуют у непатогенных штаммов, не было 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 (Рис. 16, А), N102T в PB2

субъединице и одна гетерогенная замена E358E/K также в PB2 субъединице (Рис. 16, Б). Белок PA не содержит уникальных замен (Рис. 16, В). Положение аминокислотных замен в полном полимеразном комплексе указано на рисунке 16Г [51].

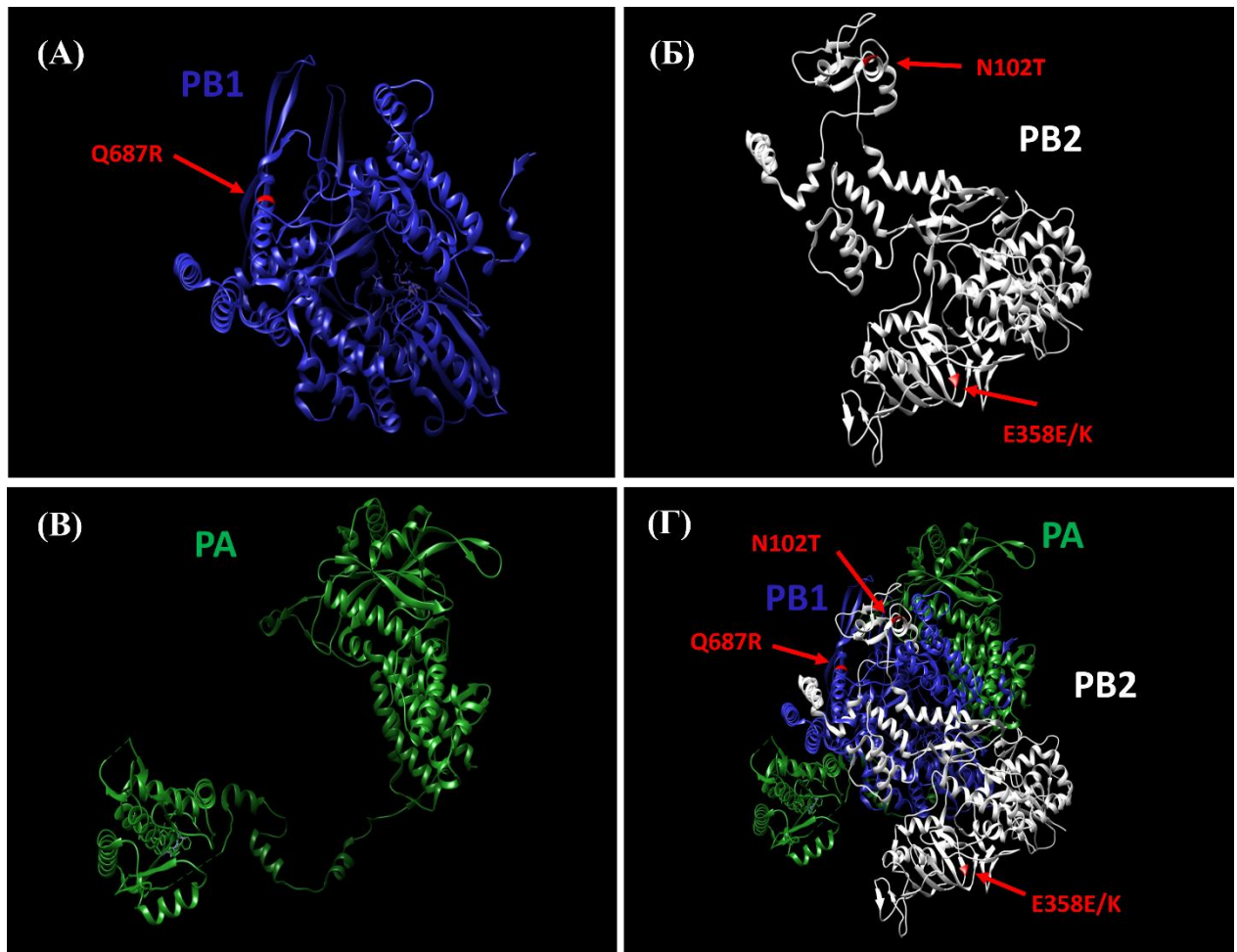


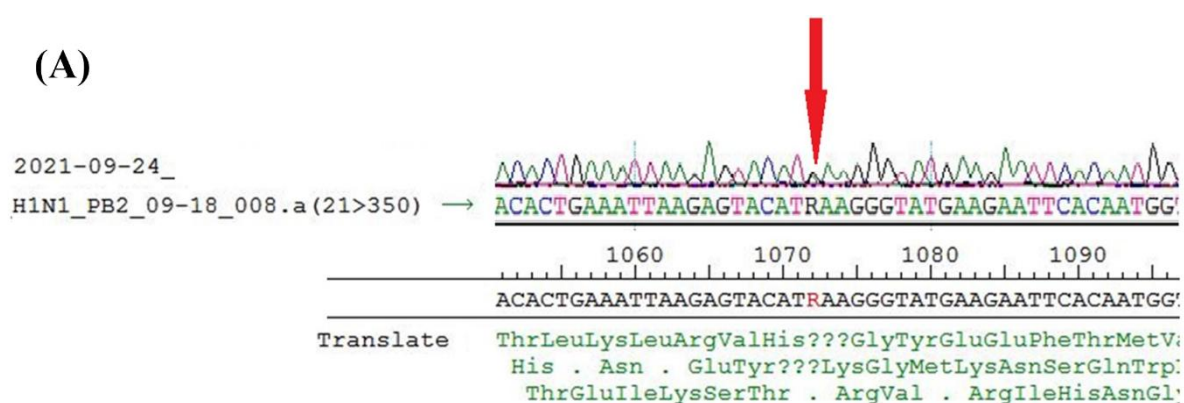
Рисунок 16. Трехмерная структура полимеразного комплекса вируса SA. (А) белок PB1 содержит уникальную замену Q687R, (Б) белок PB2 содержит две уникальные замены N102T и E358E/K, (В) белок PA не содержит уникальных мутаций, (Г) Структура полного полимеразного комплекса с тремя заменами. Для построения 3D-структуры было использовано приложение UCSF Chimera 1.15.

Мутации в PB2 и PB1 могут преобразовать *non-ts* фенотип в *ts* фенотип, что приводит к аттенуации штамма. Например, модификация адаптированного к холоду аттенуированного модельного вируса гриппа и его предшественника дикого типа (WT) с использованием различных методов (классическая реассортация или система обратной генетики на основе плазмид) продемонстрировала, что замена мутантных генов PB2 в аттенуированной модели на гены PB2 от его WT предшественника приводит к получению *non-ts* реассортанта. С другой стороны,

замена генов PB2 в WT предшественнике на мутантный PB2 из аттенуированной модели приводит к получению аттенуированного *ts* реассортанта. Те же результаты были получены при замене PB1 гена [244].

Замена Q687R в вирусе SA локализована на С-конце PB1 [49]. Остатки 678-757 на С-конце PB1 образуют сайт связывания, который необходим для плотного связывания с PB2 через его N-конец. Мутации в этом положении сильно влияют на активность полимеразы [204]. Замена N102T находится в поддомене (PB2-N1) N-терминального третьего домена, этот поддомен поддерживает домен большого пальца PB1 [49]. Исходя из этих данных, можно предположить, что эти две мутации могут повысить стабильность полимеразы, а значит, и ее активность, что может объяснить высокую патогенность вируса SA [51].

В пассаже E4, используемый для заражения мышей, гетерогенность E358E/K в PB2 субъединице является результатом гетерогенности A/G в позиции 1072 нуклеотида в сегменте гена PB2 (Рис. 17А, Таб. 2). Пик А (Рис. 17Б, короткая стрелка) имеет высоту менее 3. Из-за более высокой флуоресценции А и особенностей протокола пик был бы больше 3, если бы последовательность была ААА. Максимальная высота в положении G (Рис. 17Б, длинная стрелка) равна половине высоты. Соответственно, Приблизительное соотношение компонентов G/A в положении 1072 равно 1:1 (Рис. 17Б).



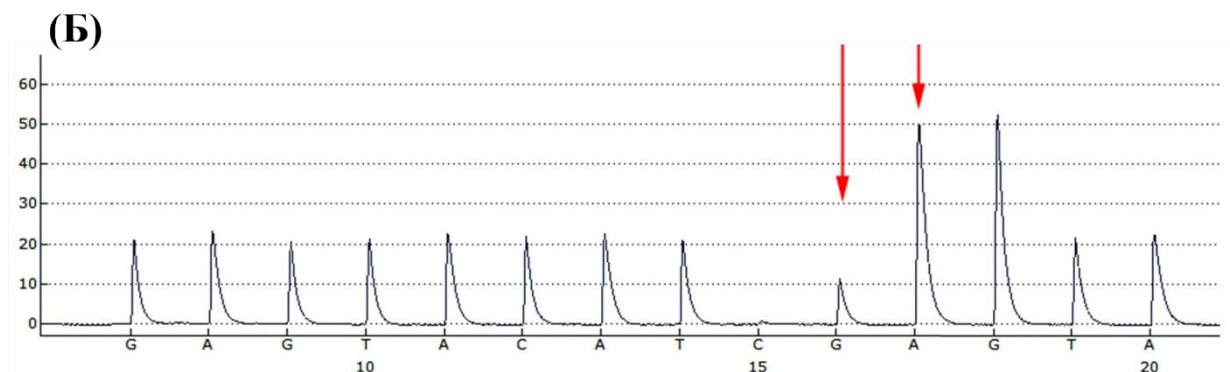


Рисунок 17. Секвенирование по Сэнгеру (А) и пиросеквенирование (Б) фрагмента 1064-1079 гена PB2 вируса SA используемый для заражения мышей

Гетерогенность A/G, выявленная в позиции 1072 нуклеотида, сохранялась в вирусной РНК, выделенной из ткани легких мышей на третий день после заражения (Рис. 18А и Б).

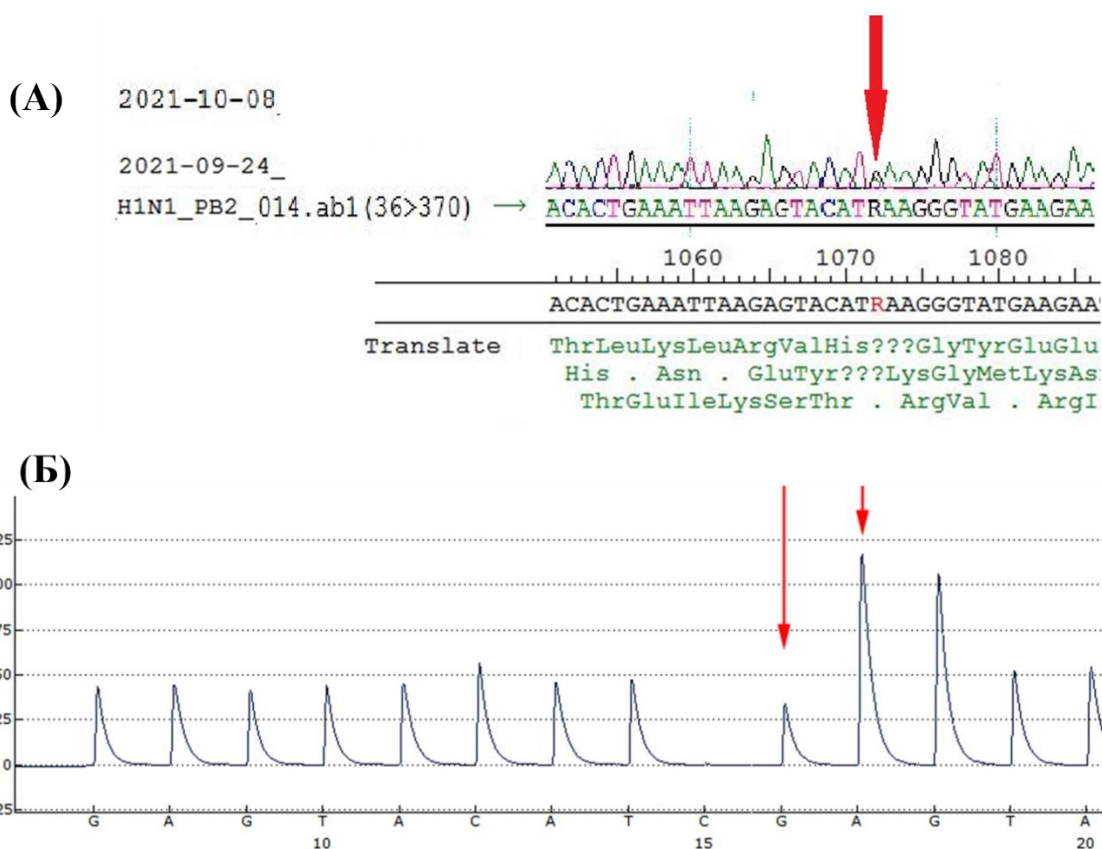


Рисунок 18. Секвенирование по Сэнгеру (А) и пиросеквенирование (Б) фрагмента 1064-1079 гена PB2 мышинных изолятов вируса SA.

Последовательность сегмента PB2 исходного штамма вируса SA E1E2/E3 (идентификатор изолята GISAID EPI_ISL_175880) также содержит гетерогенность 1072 A/G (Табл. 2). Аминокислотная позиция, в которой находится данная гетерогенность, является частью кЭП-связывающего домена белка PB2 [49], это

позволяет предположить, что она может непосредственно влиять на активность полимеразы. В нашем исследовании гетерогенность, сохраняющаяся в одинаковом соотношении даже после пассирования у мышей, демонстрирует, что оба варианта были одинаково реплицированы в легких мышей, что указывает на то, что эта замена, возможно, не влияет на патогенность вируса. Однако, чтобы подтвердить определяющую роль этих трех мутаций в патогенности вируса, необходимы дополнительные исследования.

Чтобы понять, в какой степени эти замены являются уникальными для вируса SA, исследование было расширено включением еще 134 штамма ВГА (H1N1)pdm09, выделенных в период с 2009 по 2021 год и доступных на платформе GISAID (идентификаторы изолятов GISAID приведены в Приложении, Табл. 1). Оказалось, что три вышеупомянутые замены остаются уникальными для вируса SA (Табл. 3).

Таблица 3. Уникальные замены в аминокислотной последовательности белков вируса гриппа SA.

Источник последовательности	Сегмент гена	Позиция НТ	Замена НТ	Последовательность РНК	Позиция АК	Замена АК
изолят из GISAID (ID EPI_ISL_175880)	PB1	2060	A 2060 G	CGG	687	Q687R
	PB2	305	A 305 C	ACT	102	N102T
		1071	G 1071 R	¹ RAA	358	E358E/K
SA вирус, используемый для заражения мышей	PB2	1071	G 1071 R	¹ RAA	358	E358E/K
SA вирус выделенный из мышей	PB2	1071	G 1071 R	¹ RAA	358	E358E/K
154 ³ A(H1N1)pdm09 изоляты из GISAID база данных	PB1	2060	A ²	CAG	687	Q ²
	PB2	305	A ²	AAT	102	N ²
		1071	G ²	GAA	358	E ²

¹R - пури́н (G или A).

² В этом положении замены обнаружено не было.

³134 вируса, выделенных из базы данных GISAID, в дополнение к 20 вирусам, анализированным в ходе этого исследования.

4.1.2. Сравнение штамма SA с модельным штаммом PR8

Сравнение неадаптированного штамма SA как перспективного кандидата в качестве модельного вируса с адаптированным модельным штаммом PR8 показало, что оба штамма способны расти при повышенной температуре (40 °C) и не могут

размножаться при температуре 26 °С, демонстрируя тот же выраженный *non-ts/non-ca* фенотип (Рис. 19).

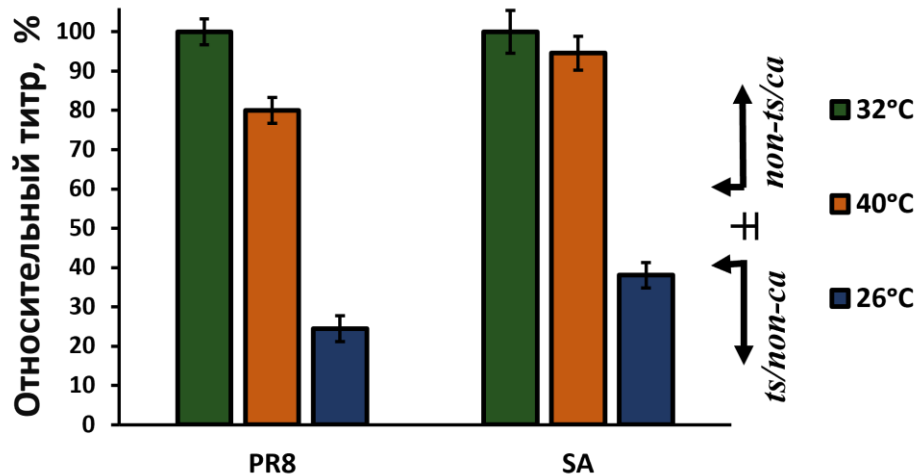


Рисунок 19. *Ts/non-ts* и *ca/non-ca* фенотипов сравниваемых вирусов. Титр вирусов после инкубации при трех различных температурах: 32 °С (зеленый), 40 °С (оранжевый) и 25 °С (синий).

Штаммы SA и PR8 обладают почти одинаковой способностью размножаться в легких мышей (Рис. 20А) и не отличаются по способности заражать их и имеют близкие значения МИД₅₀ (Рис. 20Б).

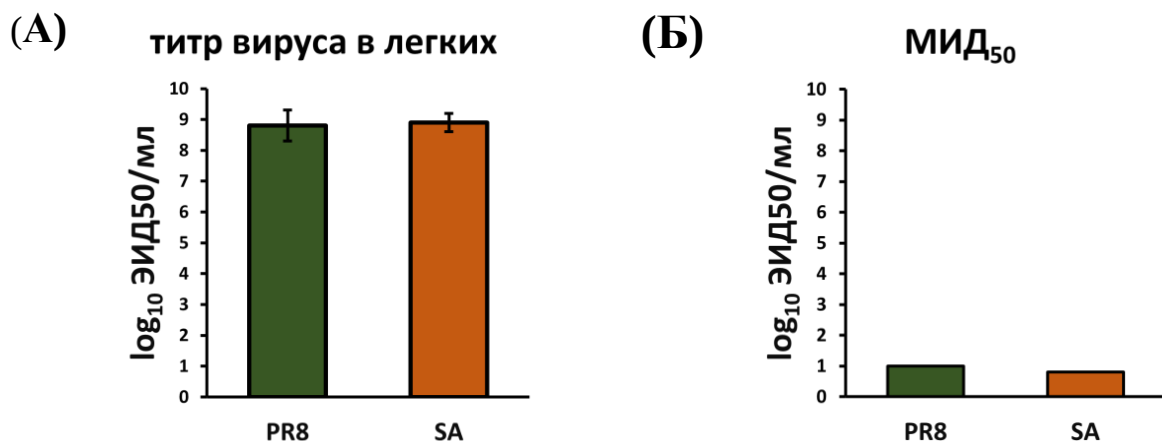


Рисунок 20. Способность вирусов SA и PR8 реплицироваться в легких мышей. (А) - титр вирусов на третий день после заражения дозой 10⁵ ЭИД₅₀/мл. (Б) – определение МИД₅₀ для тестируемых вирусов. Результаты представлены в виде log₁₀ ЭИД₅₀/мл, необходимых для того, чтобы вызвать заражение 50% мышей. Обозначения: зеленый – вирус PR8; оранжевый – вирус SA.

Интраназальное введение токсических доз как SA, так и PR8 штаммов вызывает гибель 70–80% мышей в первые дни после заражения (Рис. 21).

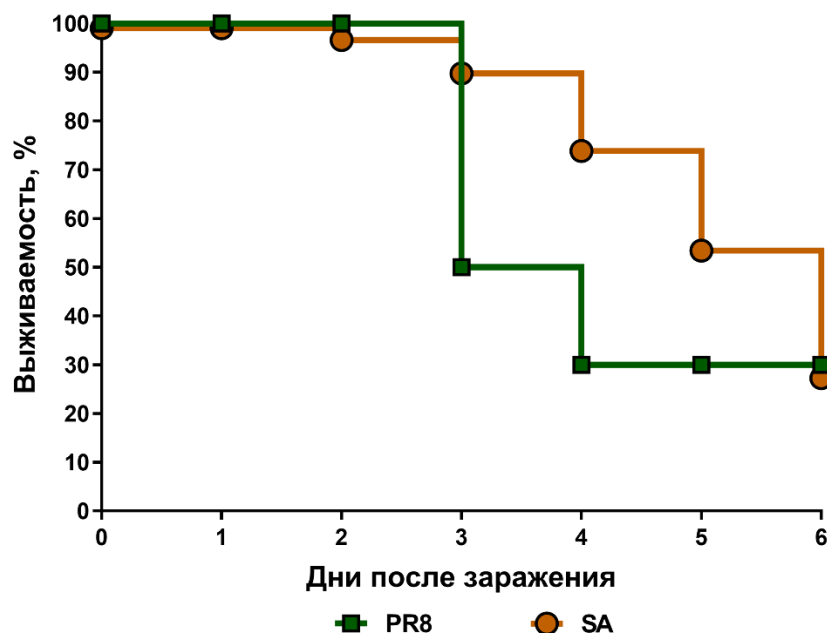


Рисунок 21. Оценка токсичности сравниваемых вирусных штаммов: модельного PR8 и кандидатного SA вируса. Мыши получали интраназально равные объемы свежей неразведенной инфекционной аллантоисной жидкости. Обозначения: зеленый – вирус PR8; оранжевый – оранжевый вирус SA. По оси ординат: выжившие, %; по оси абсцисс: дни после заражения. В каждой группе $n \geq 20$ мышей. Для количественной оценки выживаемости использовали критерий Log-rank (Mantel-Cox).

Результаты мониторинга изменений массы тела мышей показал, что оба штамма, по сравнению с контролем, вызывают потерю веса с одинаковой динамикой (Рис. 22 А, Б, и В). Кривые выживаемости мышей показывают, что вирусы PR8 и SA демонстрируют сходную дозозависимую способность вызывать летальность мышей (Рис. 22 Г, Д, и Е). ЛД₅₀ для вируса SA составляет 4,8 log₁₀ ЭИД₅₀/мл, а для PR8 - 4,7 log₁₀ ЭИД₅₀/мл [47].

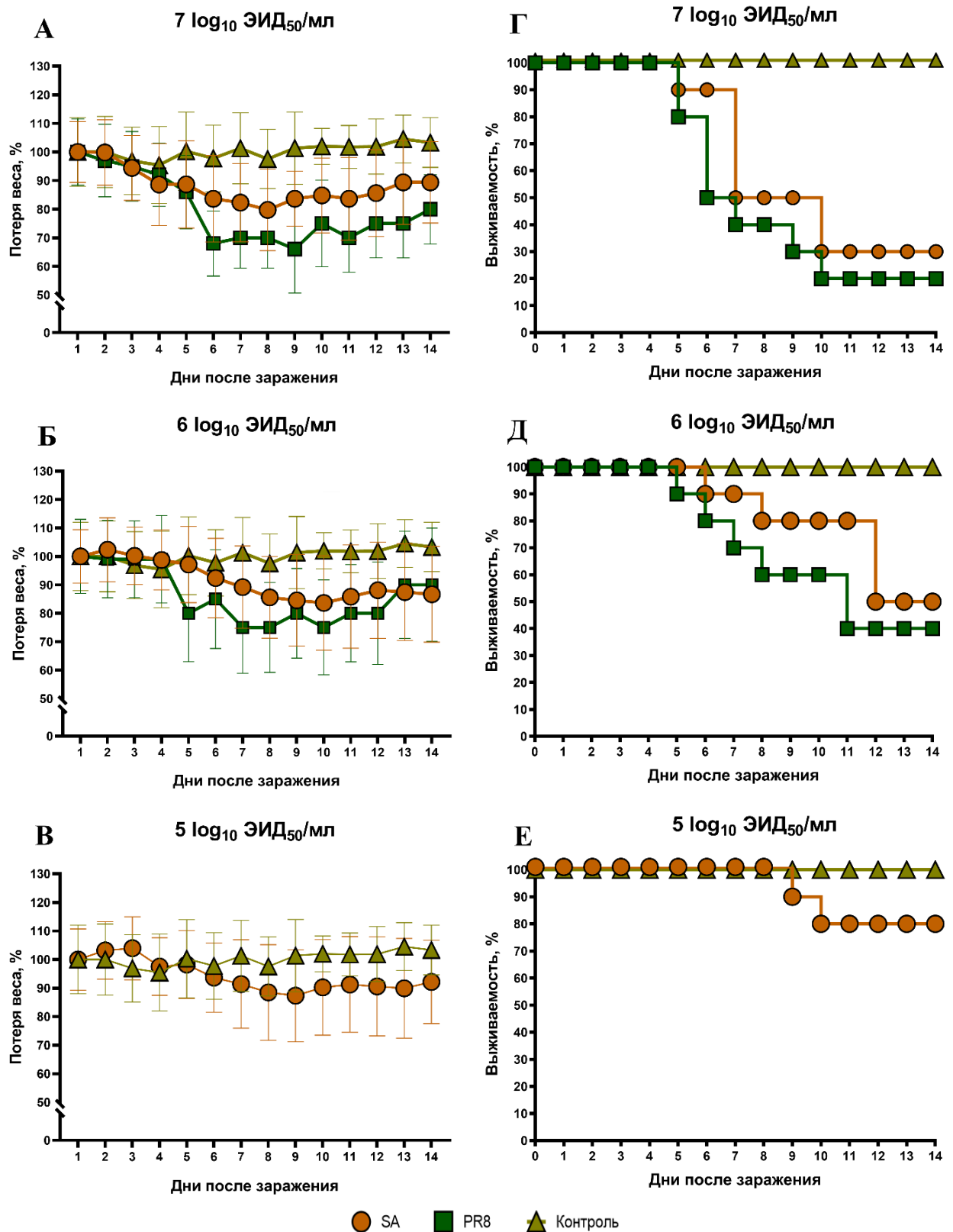


Рисунок 22. Динамика изменения массы тела мышей (А, Б, В) и летальности (Г, Д, Е) в течение 14 дней после заражения сравниваемых штаммов. Мышей интраназально заражали 50 мкл 10-кратных разведений каждого вируса: (А, Г) - $7 \log_{10} \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$, (Б, Д) - $6 \log_{10} \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$, (В, Е) - $5 \log_{10} \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$. Обозначения: зеленый – вирус PR8; оранжевый – оранжевый вирус SA. Каждая группа состояла из 10 мышей. Для статистической обработки применяли однофакторный дисперсионный анализ с использованием апостериорного теста Тьюки для

множественных сравнений; для количественной оценки выживаемости использовали критерий Log-rank (Mantel-Cox).

В совокупности полученные данные позволяют считать, что циркулирующий в настоящее время неадаптированный к мышам вирус гриппа SA, может быть использован для оценки потенциальных противовирусных и антитоксических препаратов и кандидатов на вакцины, поскольку он имеет характеристики, сходные с таковыми модельного адаптированного к мышам вируса PR8 (Таб. 4) [47].

Таблица 4. Сравнение инфекционных свойств штамма SA и модельного штамма PR8.

Вирус	МИД ₅₀ log ₁₀ ЭИД ₅₀ /мл	ЛД ₅₀ log ₁₀ ЭИД ₅₀ /мл	Токсичность, %	Титр в легких, log ₁₀ ЭИД ₅₀ /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>

Преимущество неадаптированных вирусов состоит в том, что для их использования в качестве модельных не требуется дополнительных лабораторных адаптационных работ. К тому же это позволяет избежать недостатков использования классических адаптированных к мышам модельных вирусов устаревшей антигенной структуры (вирусы 1934–1968 гг. выделения), которые антигенно и генетически резко отличаются от циркулирующих вирусов и в ряде случаев имеют неясную историю прохождения. Совокупность полученных данных позволяет считать, что вирус SA может быть использован в качестве модельного вируса.

4.2. *In vivo* влияние AgNPs на репродукцию вируса SA

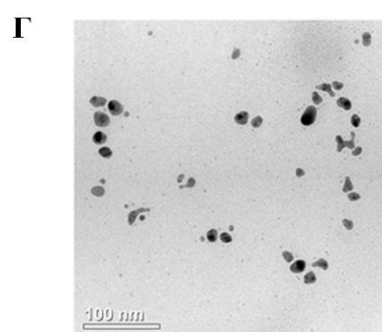
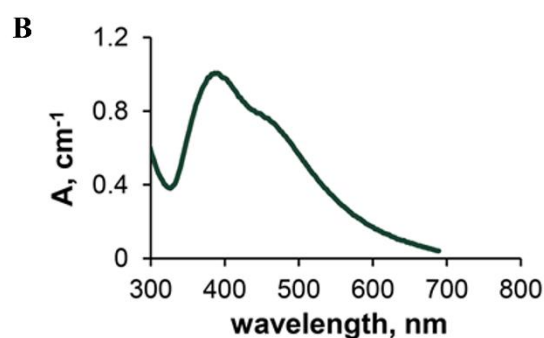
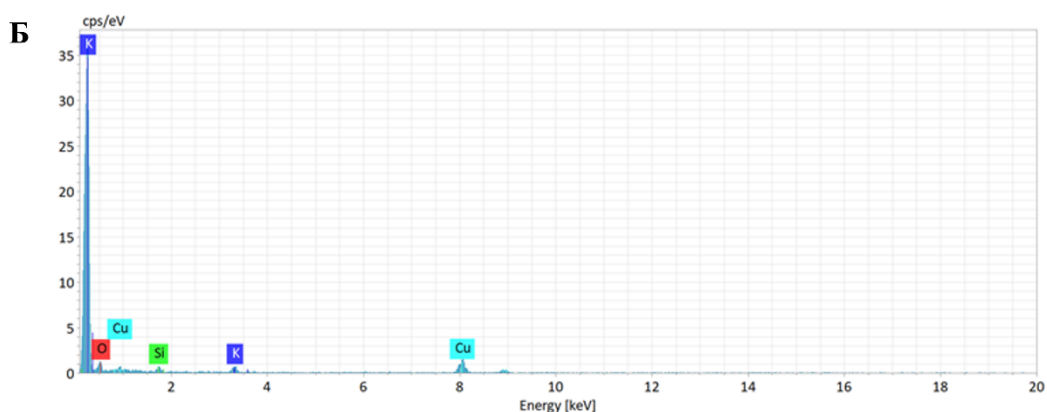
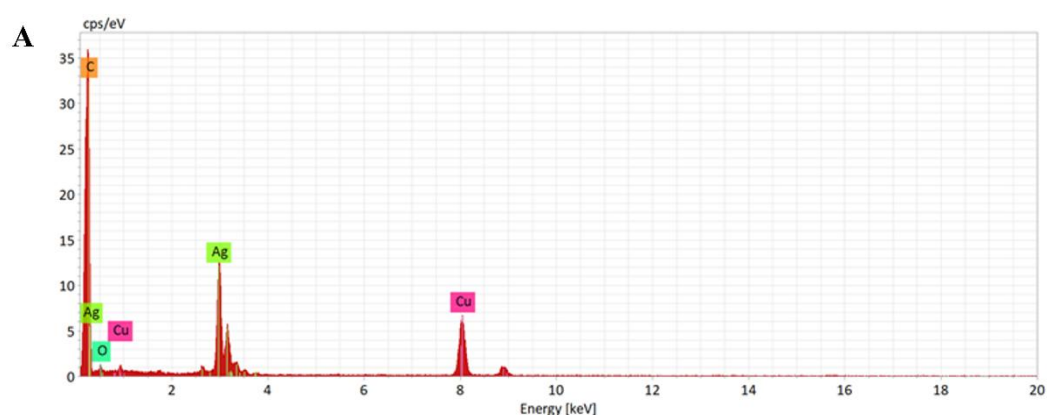
Изучение противовирусных свойств AgNPs длится примерно 10 лет и за это время тестированы частицы разной формы с линейным размером от 1 до 100 нм. Противовирусная активность AgNPs продемонстрирована на вирусах, принадлежащих к 17 различным семействам, среди которых есть, как просто устроенные безоболочечные вирусы, так и вирусы, имеющие оболочку [196]. Наибольшее количество исследований противовирусного действия AgNPs выполнено на ВГА. Исследования проведены главным образом на культивируемых

клетках, которые заражали ВГА, предварительно обработанным AgNPs [56, 196]. В них показано, что обработка нарушает морфологию вирусной частицы и/или структуру белков оболочки за счет разрыва дисульфидных связей, содержащихся в гемагглютанине [161]. Внутри клетки серебро наночастиц взаимодействует с вирусным геномным материалом, ингибирует репликацию вируса [121], подавляет активность киназ, необходимых для фосфорилирования вирусных белков, участвующих в репликации [46], проявляет иммуномодулирующую активность [195]. Однако, AgNPs, синтезированные химическим способом, демонстрируют цитотоксический эффект уже при концентрации в среде культивирования около 2 мкг/мл [22, 189]. В то же время AgNPs, произведенные методом зеленого синтеза с помощью экстракта коры коричника китайского, не проявляют цитотоксического действия на Vero клетки и при концентрации 500 мкг/мл [119]. Совокупность этих данных, полученных *in vitro*, позволило создать эффективный защитный раствор, содержащий AgNPs, для полоскания носа и рта, который был успешно использован медицинскими работниками для профилактики заражения SARSCoV-2 [99]. Кроме того, внутривенное введение AgNPs в качестве дополнения при лечении пациентов с пневмонией, вызванной SARSCoV-2, повышало показатели выживаемости [179]. Однако лицензированию AgNPs в качестве официального противовирусного препарата препятствует отсутствие достаточных исследований токсичности AgNPs и механизмов, объясняющих их противовирусные свойства.

4.2.1 Физико-химические характеристики наночастиц

Сравнение элементного состава водного раствора AgNPs (Рис. 23А) с элементным составом подложки (Рис. 23Б), полученное с помощью энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии, показывает, что образец AgNPs не содержит примеси. Сканирование препарата AgNPs в видимом и ультрафиолетовом спектрах выявляет единственную полосу поглощения с максимумом в области ~ 400 нм (Рис. 23В), характерную для кристаллических наночастиц серебра. Атомная концентрация серебра в образце, измеренная методом атомно-абсорбционной спектроскопии, составила 3,5 мМ. Согласно данным, полученным с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ),

образец содержал в основном сферические AgNPs со средним диаметром 30 нм и небольшое количество наночастиц диаметром 2 нм (Рис. 23Г). Сравнение рентгеновских спектров изготовленных AgNPs со стандартными подтвердило, что они являются нанокристаллами, о чем свидетельствует присутствие пиков при значениях 2° , $32,3^\circ$, $46,3^\circ$, $57,5^\circ$, и $77,0^\circ$, которые соответствуют (111), (200), (220) и (311) плоскостям для серебра (Рис. 23Д). «Раствор» AgNPs имел темно-коричневый цвет, который не менялся в течение года; в нем не наблюдали образования помутнения, или выпадения осадка (Рис. 23Е).



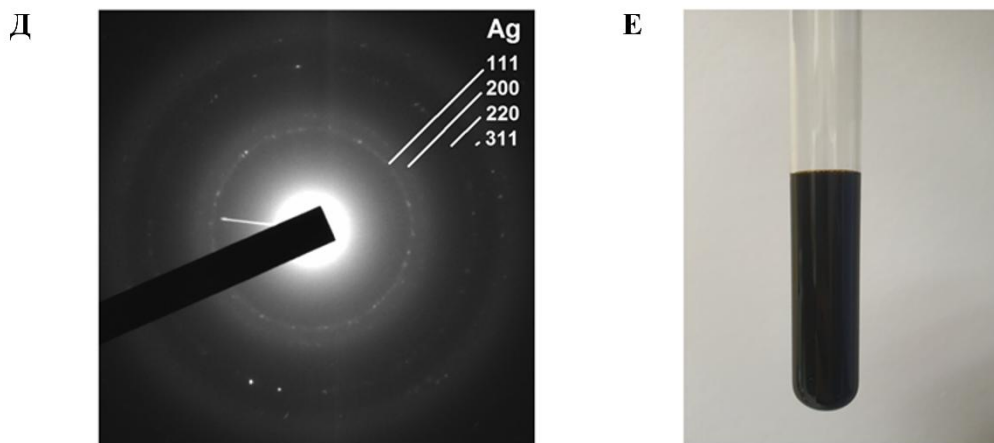


Рисунок 23. Физико-химические характеристики AgNPs. Энергодисперсионный рентгеновский спектр AgNPs (А) и пленки подложки (Б); (В) Uv/vis спектры поглощения; (Г) Изображения AgNPs, полученные методом ПЭМ; (Д) дифракционная картина электронов AgNPs; (Е) 3.5 мМ раствор AgNPs.

Препарат AgNPs был тестирован на присутствие ионного серебра. Для этого препарат наночастиц центрифугировали в режиме, описанном в разделе «Методы». После этой процедуры в надосадочной жидкости атомное серебро не было обнаружено. Это позволяет обоснованно считать, что смешанный эффект ионов Ag(I) и AgNPs, которые действуют на биообъекты по разному механизму, при использовании синтезированных наночастиц исключен [217]. Таким образом, во всех экспериментах использовали препарат сферических AgNPs с линейным размером около 30 нм, не содержащий примесей ионного серебра.

4.2.2. Динамика распределения серебра наночастиц в организме мышей

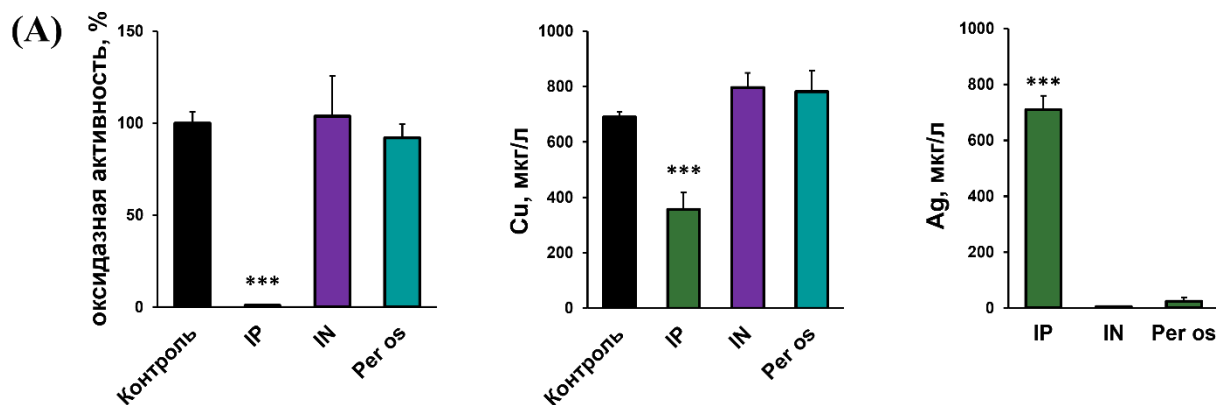
Для изучения перемещения серебра, освобождаемого с поверхности AgNPs, использованы 2 подхода: влияние способа введения наночастиц на статус меди в сыворотке крови (основными показателями которого являются концентрация общей меди, содержание иммунореактивного и энзиматически активного ЦП) мышей и динамика включения серебра наночастиц в круговорот меди. Важным параметром в обработке мышей AgNPs является их концентрация. Концентрации наночастиц, которые тестируются *in vivo*, колеблются в очень широких пределах. В экспериментах на млекопитающих показано, что после длительного воздействия в концентрациях от 2,25 до 14 мг/кг массы тела в день они не вызывают токсических эффектов. При ежедневном внутрибрюшинном введении AgNPs в течение 7 дней

по 50,0–500 мг/кг на массы тела у мышей развивается токсический эффект [95, 208, 209]. Ранее было показано, что ежедневное внутрибрюшинное введение 2 мг AgNPs на 1 кг массы тела в течение 7 дней эффективно снижает показатели статуса меди у мышей и не вызывает токсического эффекта [41, 198]. У мышей, получавших 2 мг, или 20 мг AgNPs на 1 кг массы тела, активность сывороточных трансаминаз АСТ и АЛТ, которые являются основными маркерами, определяющими нарушение функции печени, не отличалась между интактными мышами и мышами, получавшими AgNPs в течение 18 дней. Она оставалась в пределах нормального физиологического диапазона для мышей ($\text{АСТ} < 150 \text{ МЕ/л}$ и $\text{АЛТ} < 80 \text{ МЕ/л}$). Такую дозу AgNPs использовали в большинстве экспериментов.

4.2.2.1. Влияние способа введения AgNPs на статус меди у мышей

Данные о влиянии AgNPs на основные показатели статуса меди, а также серебро аккумулирующую способность печени в зависимости от способа введения наночастиц, суммированы на рисунке 24. Видно, что только при внутрибрюшинном введении AgNPs, достигается падение оксидазной активности до нуля, снижение концентрации меди примерно на 60% и накопление серебра в сыворотке крови. При введении AgNPs перорально или интраназально ни один из этих показателей, по сравнению с контролем, не меняется (Рис. 24А). Данные, приведенные на рисунке 24Б, показывают, что серебро накапливается в печени только при внутрибрюшинном введении. В то же время пероральный и интраназальный способы введения вызвали умеренное, по сравнению с фоновыми уровнем, накопление серебра. При этом концентрация меди не меняется, по сравнению с контролем, независимо от способа введения AgNPs. Нами был также испытан метод внутривенного введения AgNPs. Результаты показали, что скорость снижения оксидазной активности и концентрации меди, а также появление серебра в сыворотке крови и в печени не отличаются от таковых при внутрибрюшинном введении.

Сыворотка крови



Печень

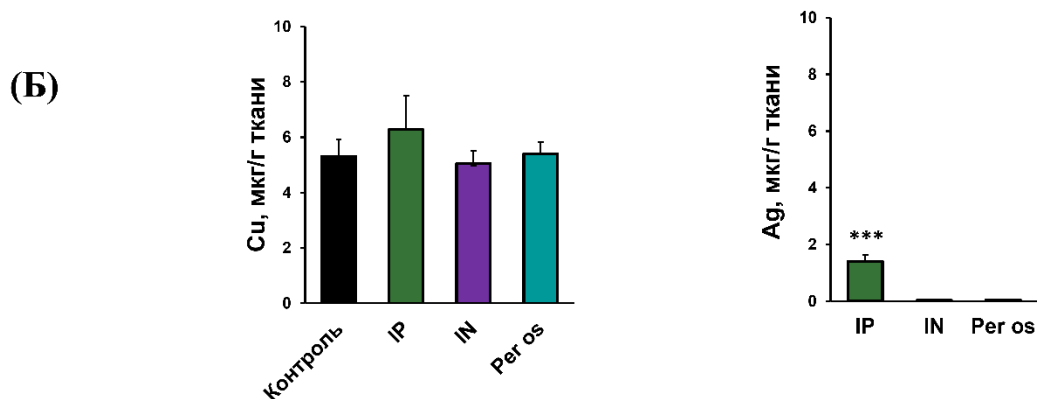


Рисунок 24. Влияние способа введения AgNPs на их биодоступность и статус меди в организме мышей. (А) оксидазная активность ЦП, концентрация меди и серебра в сыворотке крови; (Б) концентрация меди и серебра в печени. Способ введения: IP - внутрибрюшинное; IN - интраназальное; *Per os* - пероральное. В сыворотке крови и печени контрольных мышей содержание серебра не превышало 10 нг/г ткани. Статистическую обработку данных проводили при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием апостериорного теста Тьюки для множественных сравнений, *** $P < 0,0001$.

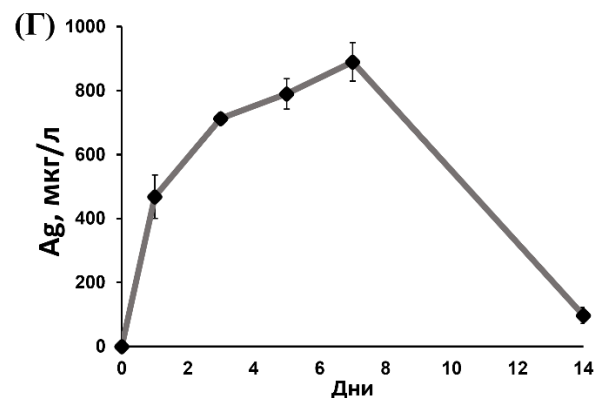
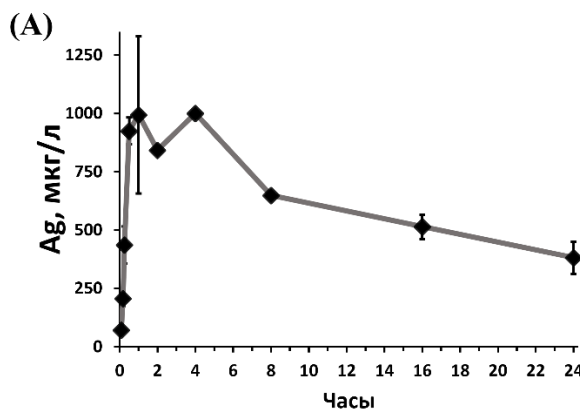
Учитывая инвазивность метода и увеличение времени на манипуляции с животными, в нашей дальнейшей работе этот метод не применяли. На основании результатов этой серии опытов в дальнейших исследованиях использовали внутрибрюшинный способ введения AgNPs [48].

4.2.2.2. Время-зависимое распределение серебра в организме мышей после однократного и многократного введения AgNPs

Результаты мониторинга перемещения серебра в сыворотке крови после однократного введения показывают, что серебро появляется не позднее, чем через 15 минут после инъекции. Его концентрация продолжает прогрессивно расти в

течение первого часа. В следующий час скорость накопления серебра снижается и затем вновь нарастает к 4 часу после введения (Рис. 25А). Изменение концентрации серебра в этот временной промежуток отражает равнодействующую поступления серебра в печень и секрции *de novo* синтезированного ЦП [100]. К концу 24-часового периода эксперимента концентрация серебра в сыворотке крови снижается примерно в 3 раза (Рис. 25А).

У мышей, получавших инъекции AgNPs регулярно (ежедневно в течение 7 дней), 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 (Рис. 25Г). К 7-му дню после отмены инъекций концентрация серебра в сыворотке крови снижается примерно в 20 раз. Слежение за изменением показателей статуса меди у этих же мышей осуществлялось параллельно с изучением перемещения серебра. Оказалось, что кривая изменения концентрации меди в сыворотке крови после однократного введения наночастиц, является противоположно направленной по отношению к таковой для серебра (Рис. 25Г и Д). При этом снижение оксидазной активности в сыворотке крови происходит синхронно с увеличением концентрации серебра и снижением содержания меди (Рис. 25Г, Д, и Е). Эти показатели полностью восстанавливаются до своих контрольных значений через 7 дней после отмены инъекций (Рис. 25Д и Е). Концентрация иммунореактивного полипептида ЦП не изменялась в течение всего эксперимента (Рис. 25Ж).



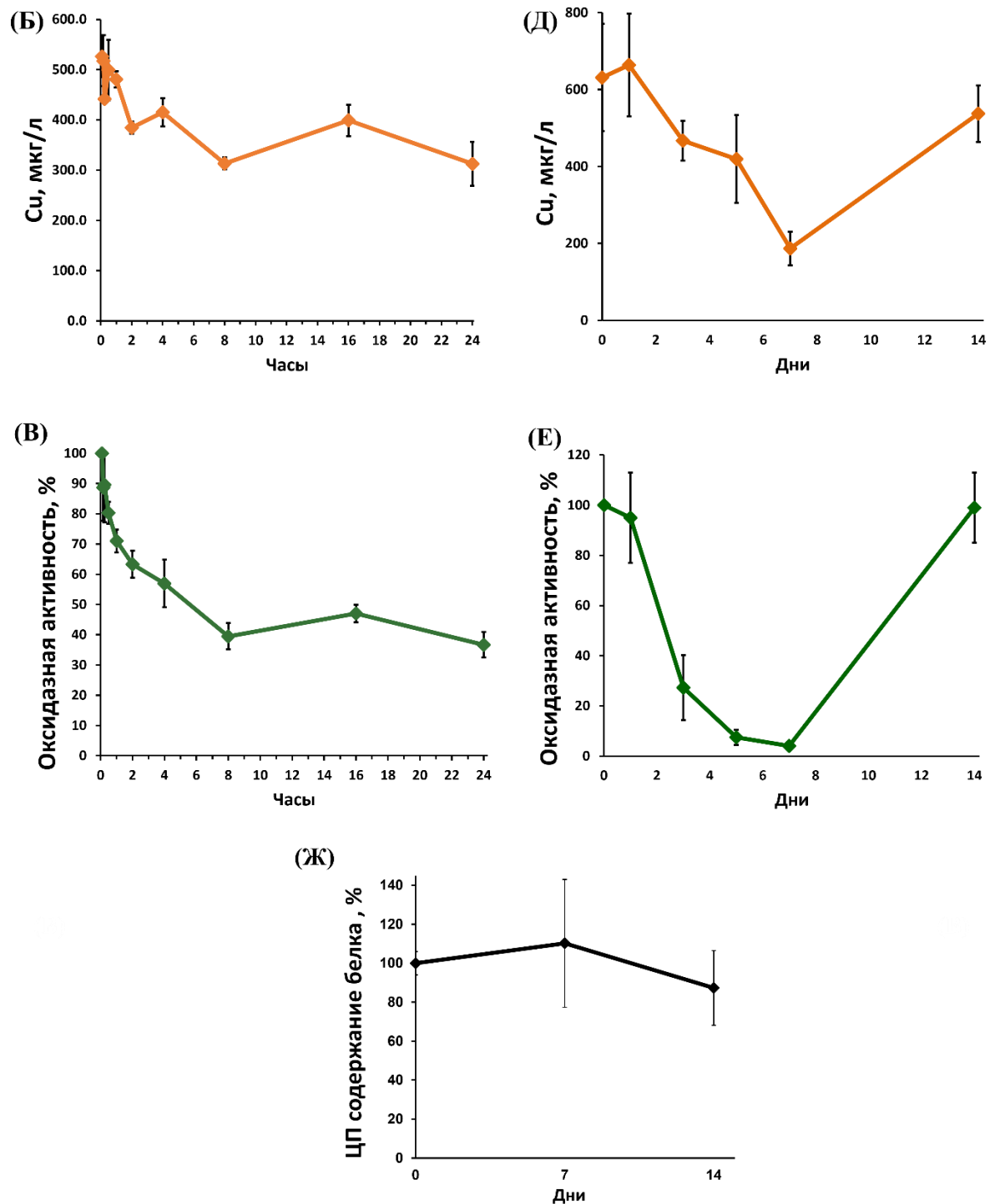


Рисунок 25. Динамика влияния абсорбированного серебра на показатели статуса меди в сыворотке крови у мышей. (А, Г): концентрация серебра; (Б, Д): концентрация меди; (В, Е): оксидазная активность ЦП после однократной инъекции AgNPs; (А, Б, В): то же, после семи ежедневных инъекций AgNPs (Г, Д, Е). Относительная концентрация полипептида ЦП, определенная методом иммуноблотинга (Ж).

В печени мышей, получавших 1-кратную инъекцию AgNPs, концентрация серебра достигает своего пика через 4 часа после инъекции, где она остается

неизменной в течение 12 часов, а затем начинает снижаться (Рис. 26А). После ежедневных инъекций в течение 5 дней концентрация серебра в печени достигает плато на четвертый день эксперимента (Рис. 26В). В легких мышей, получавших только одну инъекцию наночастиц, концентрация серебра достигает своего пика только через 8 часов после начала эксперимента, где она не меняется (Рис. 26Б). У мышей, получавших 7 ежедневных введений AgNPs, концентрация серебра в легких, как и в печени, достигает своего пика на четвертый день (Рис. 26Г). При этом удельное содержание серебра в легких, по сравнению с печенью, ниже на порядок.

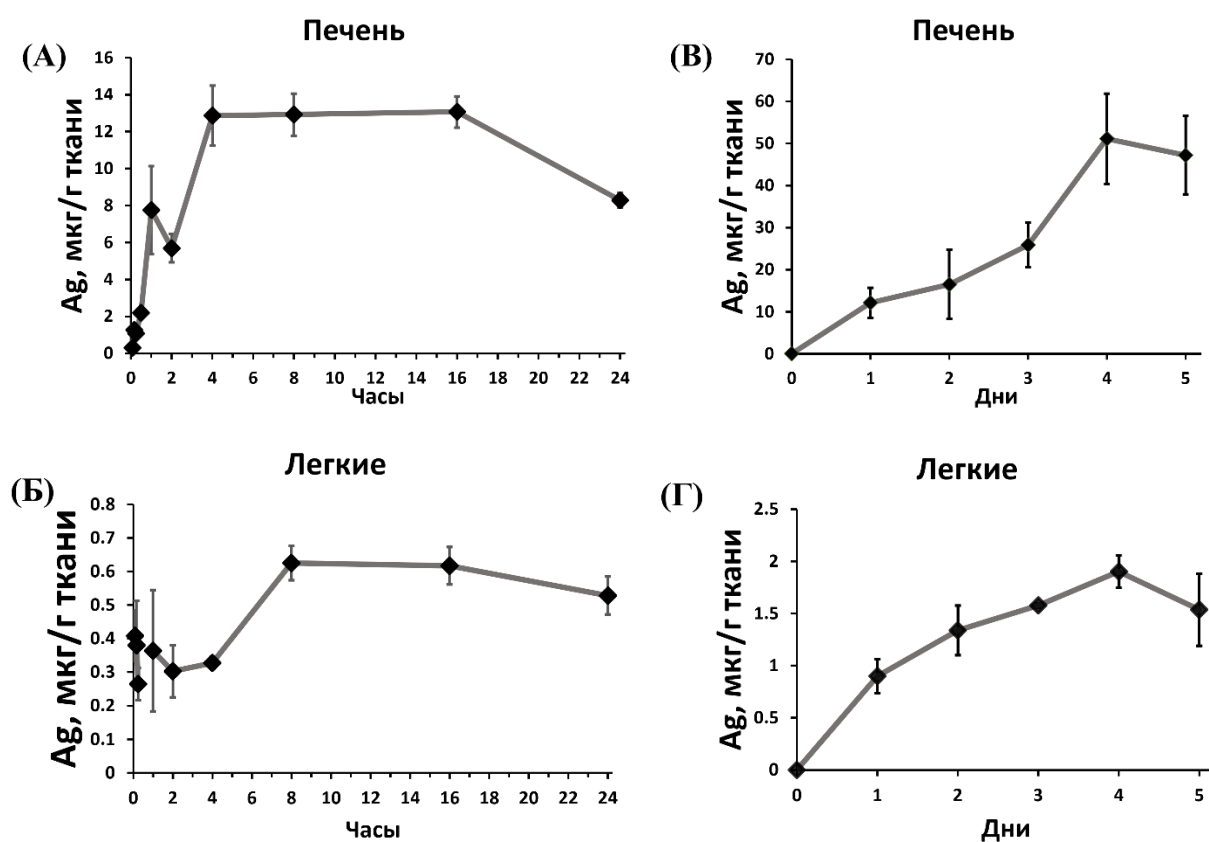


Рисунок 26. Динамика распределения серебра у мышей. Аккумуляция серебра в печени (А, В) и в легких (Б, Г) после однократной инъекции AgNPs (А, Б) или ежедневных инъекций AgNPs в течение пяти дней (В, Г).

В легких после единственной инъекции концентрация серебра достигает пика через 8 часов (Рис. 26Б), что равно времени, за которое концентрация меди и оксидазная активность ЦП снижаются до минимума в крови (Рис. 25Б и В). Между введением AgNPs и снижением содержания холо-ЦП вследствие появления в крови Ag-ЦП проходит примерно 1–2 часа. Эти данные хорошо согласуются со скоростью

синтеза, созревания и секреции ЦП в печени [100]. 50-процентное снижение оксидазной активности происходит через 8–10 часов после введения AgNPs. Именно такой интервал времени требуется для снижения на $\frac{1}{2}$ содержания сывороточного [^3H]-ЦП в экспериментах пульс-чейз типа [113]. Почти полное замещение холо-ЦП Ag-церулоплазмином происходит между 4–5 сутками, что также хорошо согласуется с данными о времени полужизни [^{67}Cu]-ЦП [44]. Динамика поступления серебра в легкие зависит от содержания Ag-ЦП в кровотоке. Это может быть только в случае, если в легкие серебро доставляет Ag-ЦП [41]. Информация о скорости перемещения серебра наночастиц в организме, динамике интервенции его в метаболизм меди, времени, необходимом для полного замещения холо-ЦП, синтезированным *de novo* в печени Ag-ЦП, а также особенностях динамики появления серебра в легких, полученная в этой части работы, учитывалась в следующих экспериментах.

4.2.3. Сравнение действия AgNPs на экспрессию генов метаболизма меди в печени и легких

На рисунке 27 обобщены ранее полученные результаты изучения экспрессии генов, обеспечивающих транспорт меди и металлизирование купроэнзимов в печени мышей, *in vivo* получавших ионное серебро или AgNPs [158, 189]. В этих работах в рассмотрение взяты гены двух мембранных транспортеров меди: CTR1, переносит Cu^{1+} из внеклеточного пространства в цитозоль, и ATP7B, которая принимает Cu^{1+} у цитозольного Cu-шаперона ATOX1 и переносит ее в люмен аппарата Гольджи (см. Рис. 5). В качестве генов купроэнзимов рассмотрены ген *Cp*, кодирующий основной внеклеточный купроэнзим, который получает медь от ATP7B в аппарате Гольджи, и ген *SOD1*, кодирующий основной цитозольный купроэнзим, СОД1, получающий медь от Cu-шаперона CCS (см. Рис. 5). Экспрессия гена *ATP7A* не рассматривалась, так как в гепатоцитах, которые составляют примерно 60% клеток печени, из двух медь-транспортных АТФаз экспрессируется только *ATP7B* [54]. Сплайс-форма мРНК, кодирующая ГФИ-ЦП также не рассматривалась, потому что она не формируется в гепатоцитах, а в печени уровень ЦП-мРНК в 90 раз выше, чем ГФИ-ЦП [154]. Приведенные данные однозначно показывают, что в печени животных,

получавших серебро, уровень экспрессии генов, участвующих в транспорте меди, а также генов, кодирующих как внутриклеточные купроэнзимы (СОД1 и СОХ), так и секреторный ЦП, не изменяется ни на уровне транскрипции, ни на уровне трансляции. Внутриклеточные купроэнзимы не теряют энзиматической активности. Исключение составляет только ЦП, его активность в сыворотке крови падает почти до нуля.

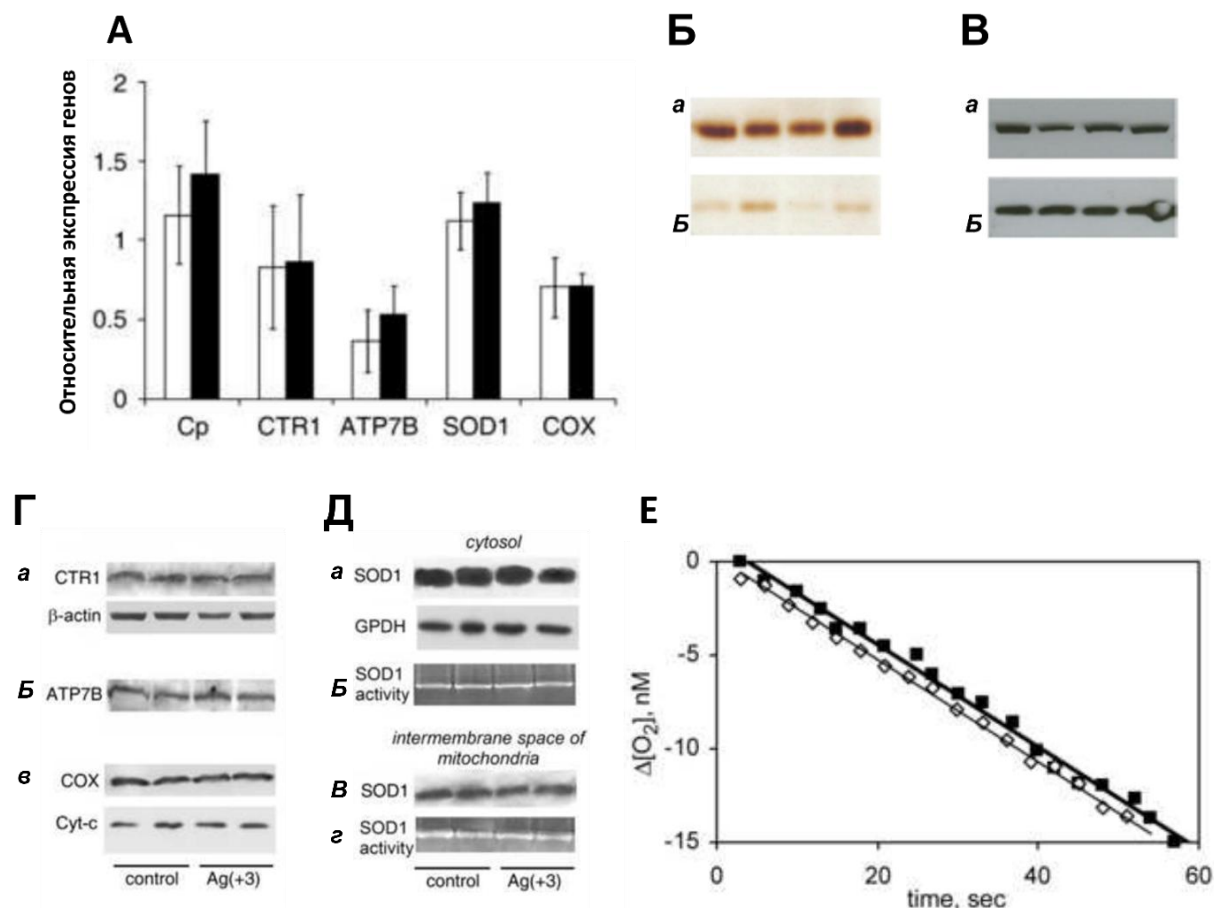


Рисунок 27. Экспрессия генов, транспортирующих медь, и купроэнзимов в печени мышей, обработанных AgNPs в течение 4 дней. **(А)** ОТ-ПЦР анализ. Обозначения: белые столбики – контроль; черные – Ag-мыши. **(Б)** оксидазная активность сыворотки крови контрольных мышей (а) и Ag-мышей (б); иммуноблотинг с антителами к ЦП в тех же образцах сыворотки (в, г, соответственно). **(В)** Иммуноблотинг с антителами к CTR1 (а), ATP7B (б) и COX (в), соответственно во фракции плазматических мембран, в мембранах аппарата Гольджи и в митохондриях. Антитела к бета-актину и цит. С использованы как референсные белки соответствующих субклеточных фракций. **(Г)** иммуноблотинг с антителами к СОД1, локализованной в цитозоле (а) и в межмембранном пространстве митохондрий (г). В качестве референсного белка цитозоля использована глицерофосфат дегидрогеназа (б). Энзиматическая активность СОД1 в цитозоле (в) и в межмембранном пространстве митохондрий (д). **(Д)** скорость поглощения кислорода митохондриями, выделенными из печени intactных мышей (белые квадраты) и Ag-мышей (черные квадраты). **(Е)** Скорость поглощения кислорода митохондриями, изолированными из печени intactных мышей (прозрачные квадраты) и из печени мышей, получавших серебро (черные квадраты); по оси абсцисс: время, сек; по оси

ординат: концентрация поглощенного кислорода. (Рисунки заимствованы из: Zatulovsky et al., 2012; Orlov et al., 2016).

В отличие от печени, сведения об экспрессии генов, обеспечивающих гомеостаз меди и металлирование купроэнзимов в легких, фрагментарны, а системные исследования не ведутся. Известно, что в легких экспрессируются гены, транспортирующие медь: *CTR1* [9], ген *ATP7A*, и если он нарушен, в легких индуцируется экспрессия гена *ATP7B* [71] а также ген *Cp*, однако, альтернативные молекулярные формы ЦП-мРНК в легких не изучены [103]. В рассмотрение были также взяты гены, кодирующие убиквитические внутриклеточные купроэнзимы и ген металлотioneина 1, связывающего $\text{Cu}^{1+}/\text{Ag}^{1+}$ [69]. В дополнение к этим генам, был также взят ген *Prnp*, кодирующий прионный белок PrP, участие которого в метаболизме меди активно дискутируется в последние годы [172]. На его выбор также повлияло то, что он активно экспрессируется в легких [108] и защищает организм мышей от гриппозной инфекции [173]. На первом этапе нами было проведено сравнительное изучение экспрессии выбранных генов в легких интактных мышей, и мышей, обработанных AgNPs. Результаты, полученные методом ПЦР в реальном времени, представлены на рисунке 28. Они показывают, что, во-первых, в легких, в отличие от печени, формируются обе сплайс-формы ЦП-мРНК и преимущественно экспрессируется *Atp7a*. Уровень экспрессии гена *Atp7b* более, чем 60 раз ниже, чем *Atp7a*, поэтому на рисунке 28 он не представлен. Во-вторых, в легких, также в отличие от печени, обработка AgNPs вызывает повышение экспрессии генов *CTR1* и *Cp*, также повышается концентрация зрелых транскриптов генов *SOD1*, *CCS*, шаперона встраивающего медь в ее активный центр, и гена металлотioneина 1 (*MT1*).

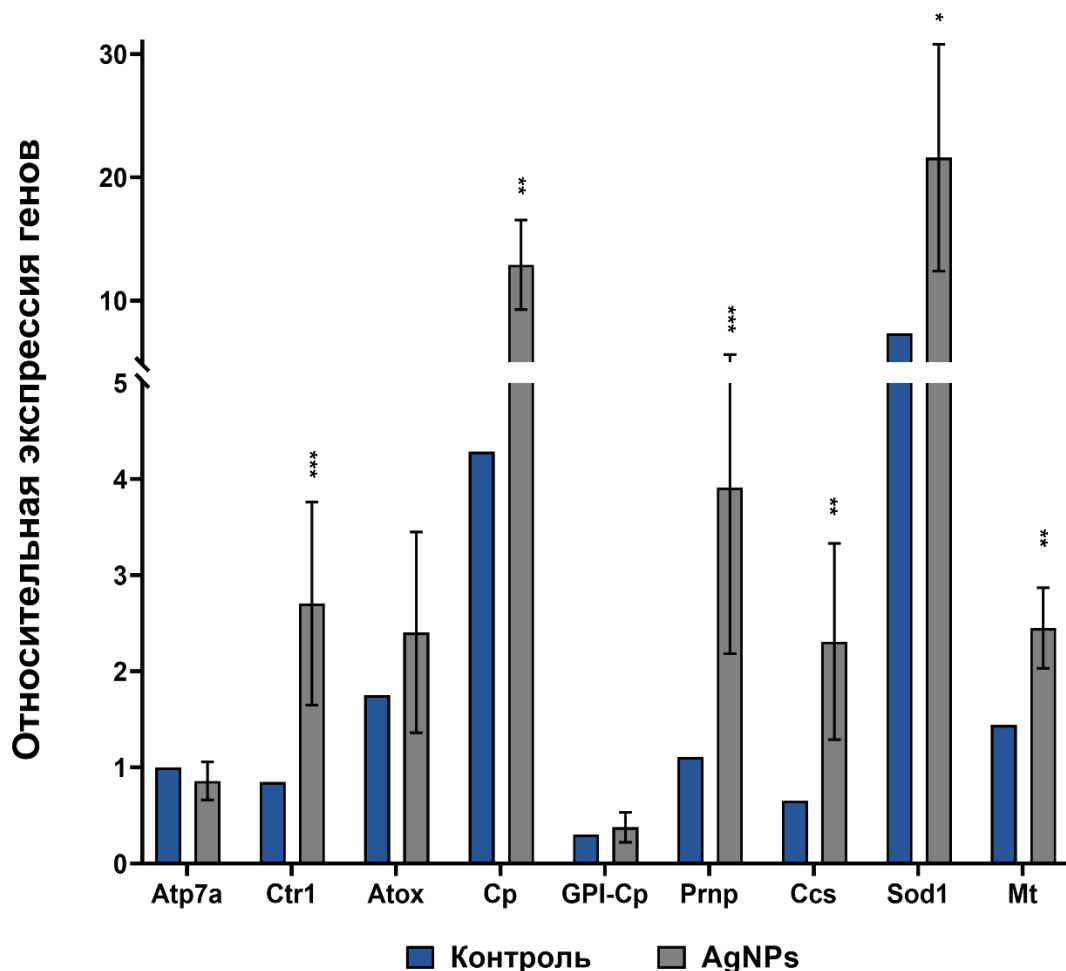


Рисунок 28. Влияние AgNPs на экспрессию генов метаболизма меди в легких. Интактные мыши – голубой; Ag-мыши – серый, данные сравнивали с использованием непарного t-критерия с поправкой Уэлча.

Отмеченная разница в профиле генов, экспрессирующихся в печени и легких, возможно, объясняется тем, что источником меди для печени является медь, абсорбированная в ЖКТ [232], в то время как донором меди для клеток легких является холо-ЦП [147]. Обработка AgNPs не подавляет всасывание меди в кишечнике и ее поступление в гепатоциты. Поэтому в гепатоцитах нет дефицита меди, и экспрессия генов, активность которых контролирует уровень меди, не меняется. Напротив, в легочных клетках Ag-мышей развивается дефицит меди и, как следствие, активность генов *Ctrl*, *Cp* и пары *Sod1* и *Ccs* повышается.

Таким образом, в легочных клетках дефицит меди, вызванный обработкой AgNPs, стимулирует транскрипционную активность, по крайней мере, трех генов, участвующих в защите от вирусной инфекции: *Ccs*, *Sod1* и *Prnp*. К тому же, представленные результаты хорошо согласуются с данными об участии в регуляции

активности генов *Ctrl* и *Sod1*, медь-зависимого транскрипционного фактора Sp1 [157, 201], а также с данными о существовании обратной зависимости экспрессии гена *Cr* и шаперона *Ccs* в клетках негепатоцитарных рядов от дефицита сывороточной меди, то есть от уровня холо-ЦП [154].

4.2.4. Влияние AgNPs на патогенность вируса SA

Учитывая полученные ранее результаты, мы начинали обработку AgNPs за пять дней до заражения вирусом и продолжали до конца эксперимента. При такой постановке опыта репликация ВГА и развитие гриппозной инфекции происходят на фоне низких показателей статуса меди. Мышей ($n = 10$) заражали 10 ЛД₅₀ вируса SA. Для оценки влияния AgNPs на летальность мышей от пневмонии наблюдение проводили в течение 14 дней после заражения (Рис. 29). Результаты показывают, что обработка AgNPs в концентрации 2,0 мг/кг массы тела повышает выживаемость мышей на 70% (Рис. 29). Также продолжительность жизни мышей, зараженных ВГА и необработанных AgNPs, составляла 7,5 дней, в то время как у мышей зараженных ВГА и получавших AgNPs, она повышалась до 11,7 дней (Рис. 29).

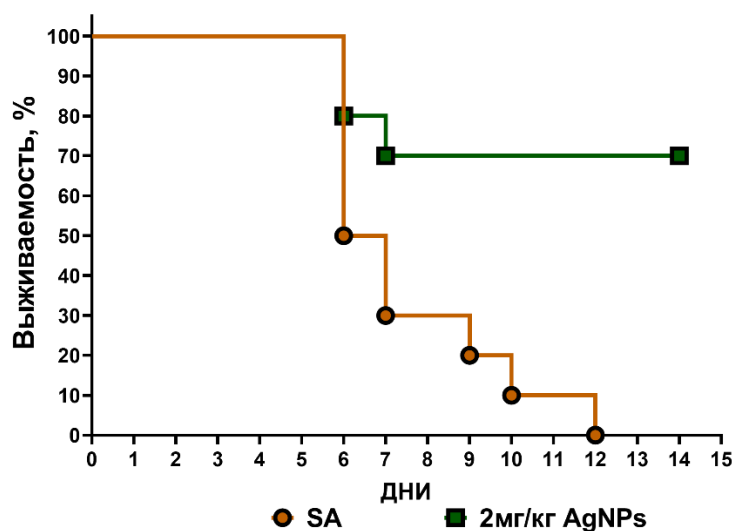


Рисунок 29. Влияние AgNPs на летальность мышей, зараженных вирусом SA. Для количественной оценки выживаемости использовали критерий Log-rank (Mantel-Cox),

Для оценки влияния AgNPs на репродукцию вируса SA четыре группы мышей (по 5 в каждой) были инфицированы 10-кратными разведениями вируса SA (10^{-2} ЛД₅₀, 10^{-1} ЛД₅₀, 1 ЛД₅₀, 10 ЛД₅₀) и обработаны AgNPs. Данные показывают, что

обработка AgNPs не влияет на способность вируса к репликации в нижних дыхательных путях (Рис. 30).

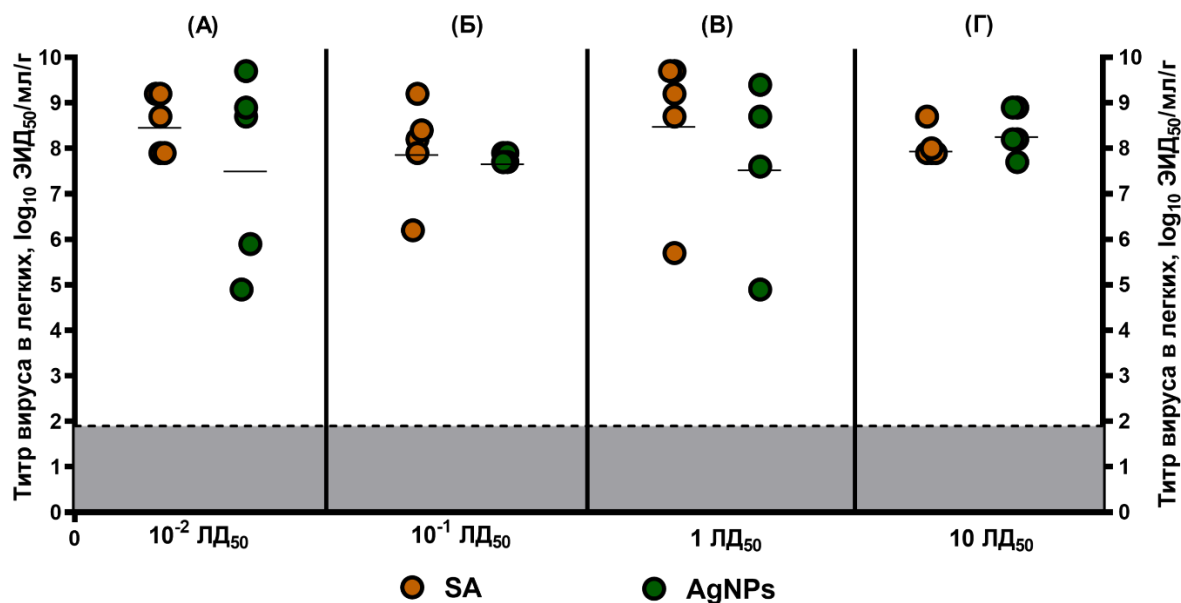


Рисунок 30. Влияние AgNPs на репродукцию вируса гриппа в легких мышей. Мыши, инфицированные SA (оранжевый), мыши, инфицированные вирусом SA и обработанные AgNPs (зеленый), было использовано четыре дозы вируса, порог обнаружения (серая зона). Данные сравнивали с использованием непарного t-критерия с поправкой Уэлча. Для статистической обработки данных был использован непарный t-критерий с поправкой Уэлча

Данные однозначно показывают, что снижение патогенности ВГА при обработке AgNPs, происходит не благодаря прямому действию наночастиц на процессы, обеспечивающие репродукцию вирусных частиц[242].

4.2.5. Влияние гриппозной инфекции на показатели статуса меди у мышей, получавших AgNPs

Оксидазная активность была измерена у мышей четырех групп (в каждой группе $n = 6$): интактная группа (контроль), инфицированная группа без обработки AgNPs (SA), группа (AgNPs), в которой мыши получали только 2,0 мг/кг AgNPs, а также группа (AgNPs+SA) где животные инфицированы вирусом SA на фоне обработки 2,0 мг/кг AgNPs. Оксидазную активность ЦП в образцах сыворотки крови, измеряли каждые 3 дня со дня заражения мышей до 9-го дня, при этом следили, чтобы ни у одной мыши кровь не отбирали чаще, чем один раз в 6 дней. Результаты показали, что заражение вирусом SA, приводит к повышению оксидазной активности примерно в 2.5 раза (Рис. 31). У мышей, обработанных

AgNPs, уровень оксидазной активности был ниже детектируемого на протяжении всего эксперимента и оставался таким же после зараженных вирусом SA (Рис. 31).

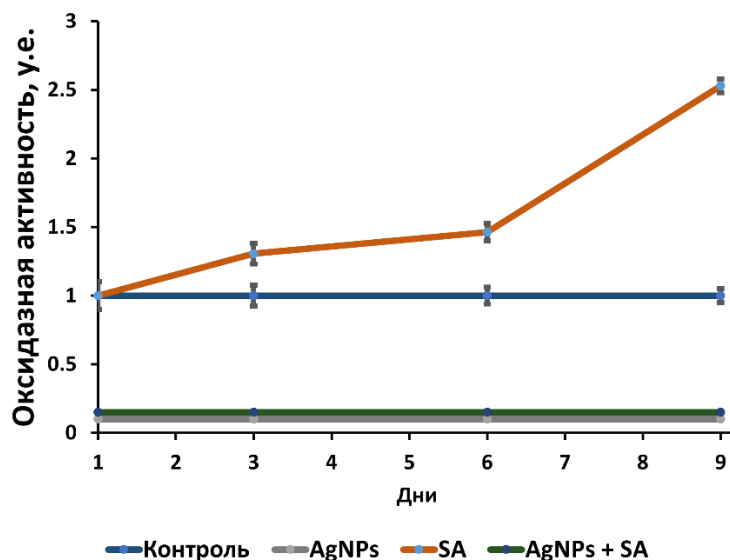


Рисунок 31. Изменение оксидазной активности на фоне гриппозной инфекции и обработки AgNPs. Мышей заражали 10 ЛД₅₀ вируса SA. Концентрация AgNPs 2 мг/кг масса тела. По оси абсцисс: дни после заражения; по оси ординат: оксидазная активность, у.е.

Следующая часть исследования была проведена на образцах, которые были собраны на третий день после заражения вирусом SA. Полученные результаты представлены на рисунке 32. Видно, что концентрация меди (Рис. 32А) и серебра (Рис. 32Г) в сыворотке крови, мышей, зараженных вирусом SA, на фоне регулярных введений AgNPs, на третий день после заражения коррелирует с оксидазной активностью ЦП (см. Рис. 31). Ни обработка AgNPs, ни заражение вирусом SA не влияют на содержание меди в печени, однако, у мышей, получавших AgNPs, заражение вирусом вызывает достоверное повышение концентрации меди (Рис. 32Б). Удельное содержание меди в легких мышей, получавших AgNPs и зараженных вирусом SA, снижается (Рис. 32В). При этом содержание серебра в сыворотке крови и печени у зараженных вирусом мышей не меняется достоверно (Рис. 32Г и Д). Среднее значение уровня содержания серебра в этих же образцах легких было не значимо, однако тенденция изменений была такой же, как и у меди, возможно, потому что серебро передаётся тем же путем (Рис. 32Е).

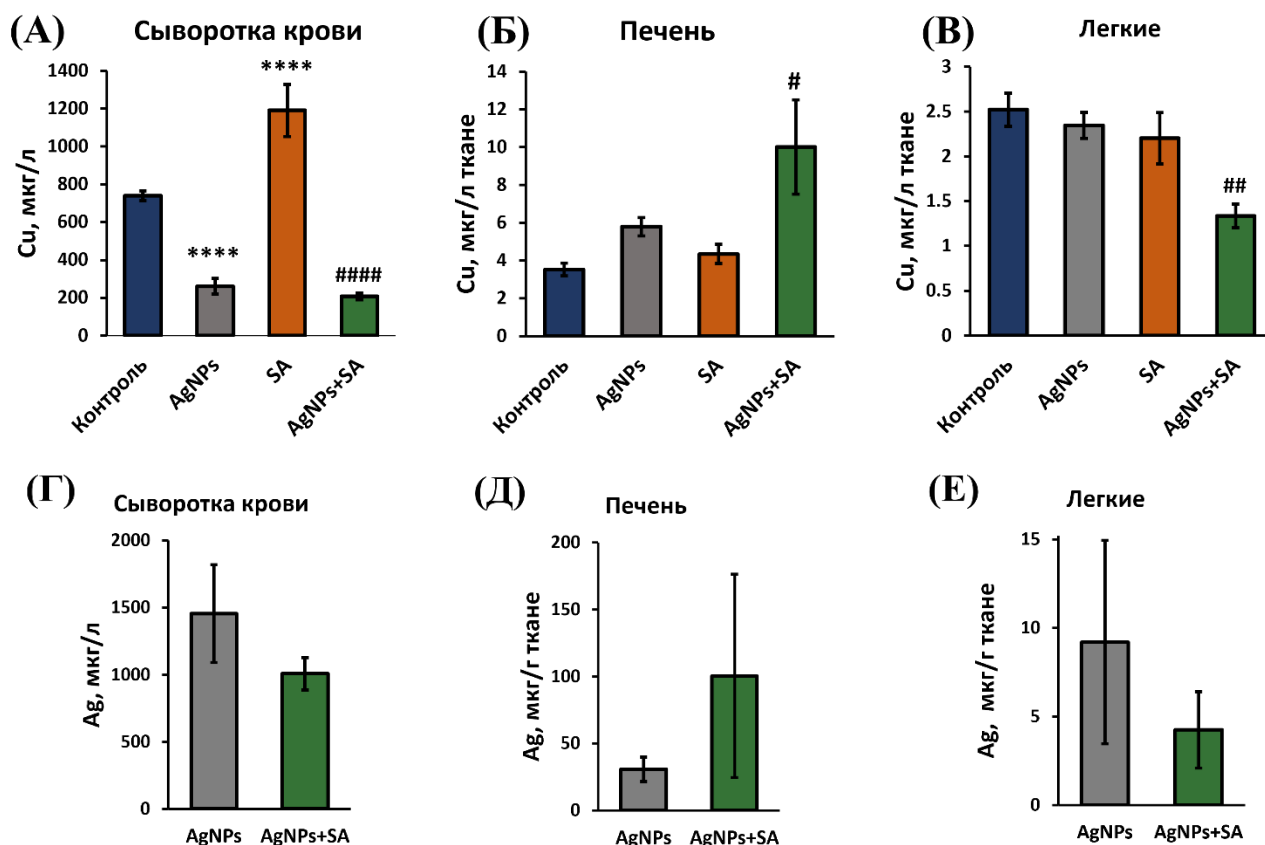


Рисунок 32: Концентрация меди и серебра после заражения вирусом SA и обработки AgNPs. Концентрация меди в сыворотке крови (А), печени (Б) и легких (В). Концентрация серебра в сыворотке крови (Г), печени (Д), и легких (Е). В каждой группе было по пять мышей. Статистическая обработка данных проводилась при помощи двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием апостериорного теста Тьюки для множественных сравнений $*P < 0,05$; $****P < 0,0001$ по сравнению с контролем, $\#P < 0,05$; $##P < 0,005$; $####P < 0,0001$ взаимодействие между двумя факторами (SA и AgNPs). Для анализа данных по серебру был использован непарный t -критерий с поправкой Уэлча.

4.2.6. Влияние AgNPs на уровень экспрессии генов метаболизма меди в легких мышей, зараженных вирусом SA

В следующей серии экспериментов в легких мышей, зараженных вирусом SA, оценивали активность генов, участвующих в метаболизме меди. Результаты количественной ПЦР, представленные на рисунке 33, показывают, что концентрация мРНК, программирующая синтез ATR7A, ЦП, ГФИ-ЦП, MT1 и PrP, увеличивается при заражении вирусом SA и снижается при обработке AgNPs. Напротив, уровень мРНК, кодирующей CTR1 и COD1 подавляется вирусом SA, однако, при обработке AgNPs их экспрессия восстанавливается, особенно COD1-мРНК, концентрация которой восстанавливается почти до контрольных значений (Рис. 33).

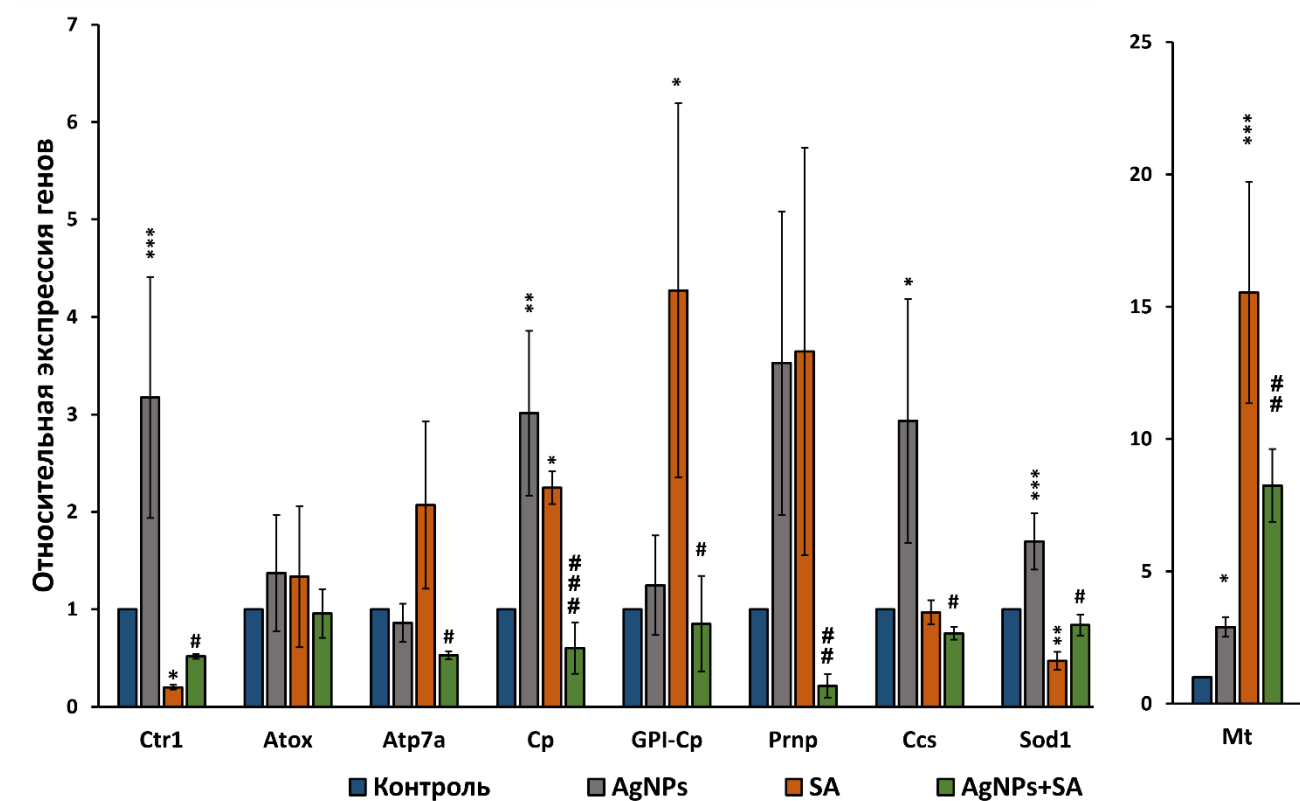


Рисунок 33. Влияние вирусной инфекции и AgNPs на активность генов, ассоциированных с метаболизмом меди в легких. Статистическая обработка данных проводилась при помощи двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием апостериорного теста Тьюки для множественных сравнений $*P < 0,05$; $**P < 0,005$; $***P < 0,0005$ по сравнению с контролем, $\#P < 0,05$; $##P < 0,005$; $###P < 0,0005$ взаимодействие между двумя факторами (SA и AgNPs).

Можно считать, что у мышей, инфицированных вирусом SA и обработанных AgNPs, активность провирусных генов хозяина подавляются, в то время как активность противовирусных генов активируется.

4.2.7. Влияние AgNPs на экспрессию некоторых генов на уровне трансляции и формировании зрелых белков в легких мышей, зараженных вирусом SA

Оценка влияния AgNPs на уровне трансляции и ферментативной активности СОД1 у мышей, зараженных вирусом SA, показала, что вирус снижает как содержание иммунореактивных полипептидов СОД1 (Рис. 34А), так и ее активность (Рис. 34Б). У мышей, зараженных вирусом SA на фоне обработки AgNPs, восстанавливается синтез СОД1, а ее активность имеет тенденцию к повышению (Рис. 34Б).

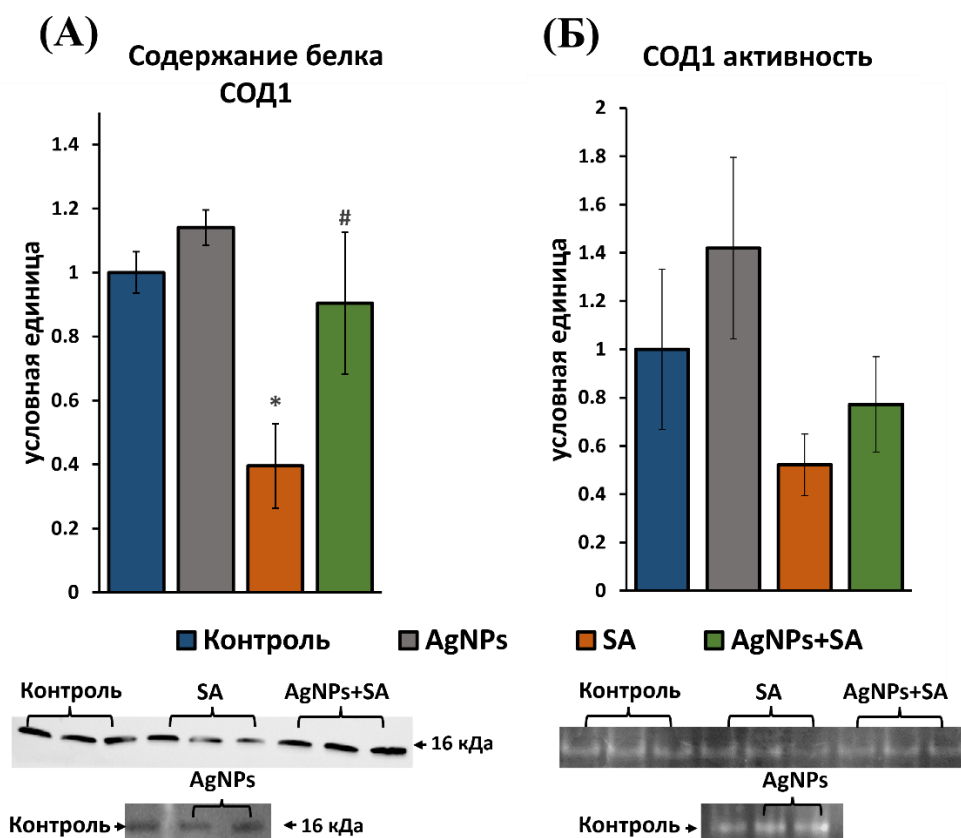


Рисунок 34. Относительное содержание иммунореактивных полипептидов СОД1 (А) и ее активность (Б) у мышей, зараженных вирусом SA и обработанных AgNPs. Статистическая обработка данных проводилась при помощи двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием апостериорного теста Тьюки для множественных сравнений $*P < 0,05$; по сравнению с контролем, $\#P < 0,05$ взаимодействие между двумя факторами (SA и AgNPs).

Это наблюдение согласуется с представлениями о существовании множественных уровней регуляции формирования энзиматически активной СОД1, которая, помимо участия в антиоксидантной системе, поддерживает окислительно-восстановительный баланс и является транскрипционным фактором, то есть относится к категории “moonlighting proteins”, что характерно для ключевых жизнеобеспечивающих энзимов [60].

По данным иммуноблотинга концентрация иммунореактивных полипептидов CTR1 снижается у мышей, зараженных вирусом SA, и восстанавливается после обработки AgNPs (Рис. 35).

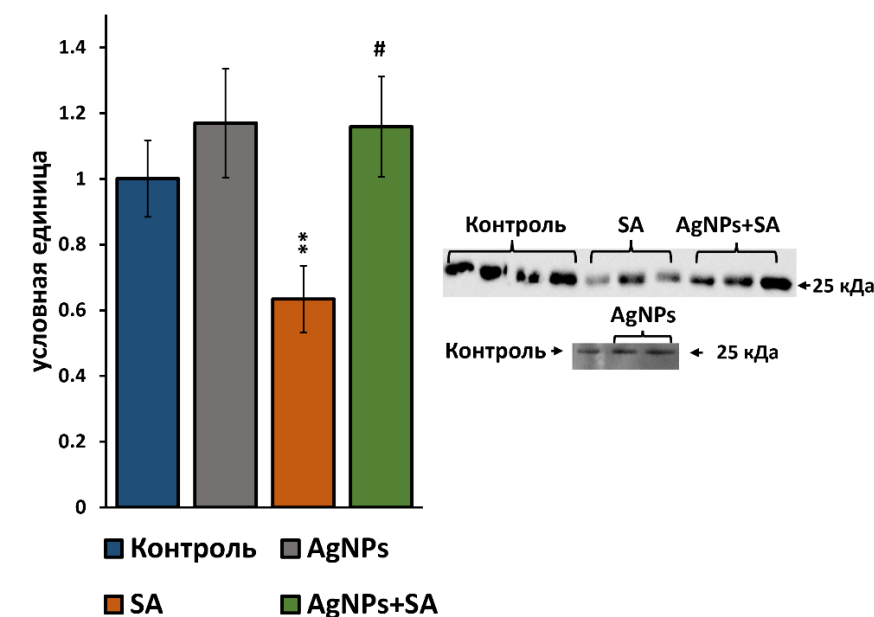


Рисунок 35. Относительное содержание иммунореактивных полипептидов CTR1 у мышей, зараженных вирусом SA и обработанных AgNPs. $**P < 0,005$; по сравнению с контролем, $\#P < 0,05$ взаимодействие между двумя факторами (SA и AgNPs).

Как и в случае с СОД1, содержание белка CTR1 у мышей, получавших AgNPs, не отличается от такового у контрольных мышей, что не коррелирует с повышением активности гена *CTR1* наночастицами (Рис. 35 *versus* Рис. 33). Такое несоответствие, возможно, связано с тем, что регуляция экспрессии гена CTR1 осуществляется на уровне транскрипции, трансляции, пост-трансляционного расщепления и эндоцитоза [219]. К тому же транспорт меди в клетку является не единственной функцией, которую выполняет CTR1. CTR1 также участвует в эмбриогенезе и поддержании гомеостаза меди у взрослых млекопитающих [132].

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. 36). При этом в клетках легких мышей, зараженных вирусом SA, концентрация мРНК, программирующей синтез ГФИ-ЦП, увеличивается, а обработка AgNPs нивелирует это повышение, содержание иммунореактивного ЦП, связанного с мембраной, не меняется (Рис. 36А). Однако его оксидазная активность падает при обработках серебром, независимо от того, заражены ли мыши вирусом SA, или нет (Рис. 36Б). Это свидетельствует о том, что

серебро, доставленное в легочные клетки Ag-ЦП, включается в круговорот меди в этих клетках.

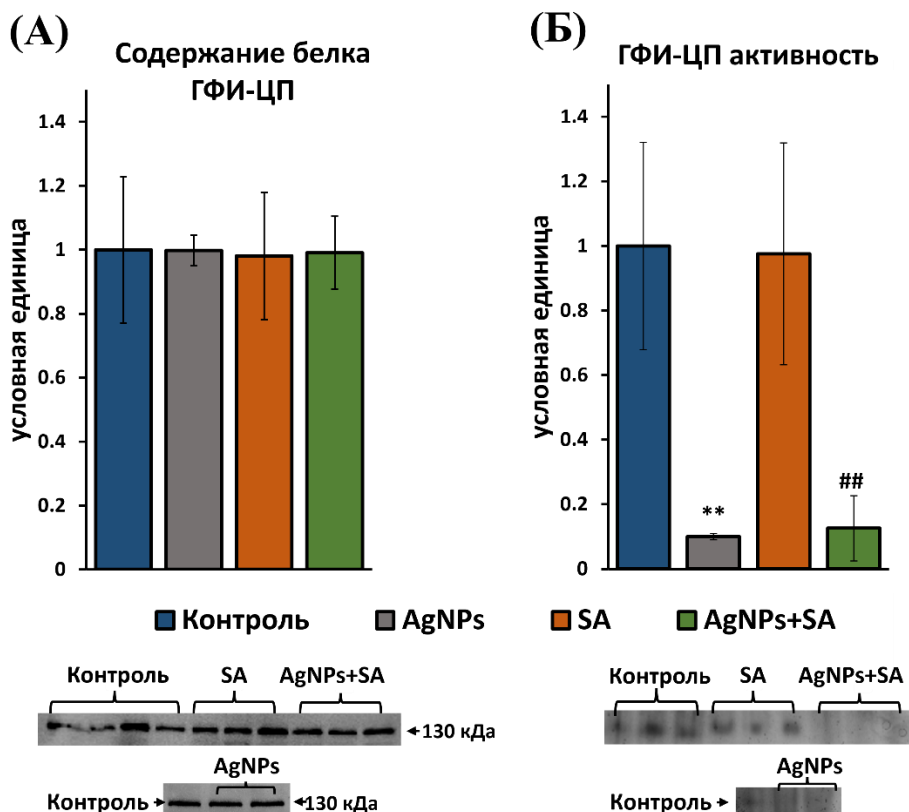


Рисунок 36. (А) Относительное содержание иммунореактивных полипептидов ГФИ-ЦП во фракции плазматических мембран легочных клеток мышей. (Б) Оксидазная активность в этих же субклеточных фракциях. $**P < 0,005$; по сравнению с контролем, $##P < 0,005$ взаимодействие между двумя факторами (SA и AgNPs).

Данные, приведенные на рисунке 36, впервые однозначно демонстрируют, что в клетках легких экспрессирует ГФИ-ЦП. Однако точных данных, подтверждающих, что в легких синтезируется секреторный ЦП, нет. Определить содержание иммунореактивных полипептидов секреторного ЦП и его энзиматическую активность в условиях наших опытов затруднительно, так как во внеклеточной жидкости невозможно отличить ЦП, синтезированный легочными клетками, от ЦП печеночного происхождения. Поэтому затруднительно подтвердить данные об изменении экспрессии гена секреторного ЦП на уровне транскрипции в легких мышей, зараженных вирусом SA и обработанных AgNPs (Рис. 33). С другой стороны, было показано, что клетки линии A549, происходящие из базального альвеолярного эпителия, продуцируют и секретируют холо-ЦП в среду культивирования [9]. Поэтому, на основании данных ПЦР-анализа, можно

думать, что синтез растворимого ЦП, как и ГФИ-ЦП, в клетках легких увеличивается при заражении вирусом SA и снижается при обработке AgNPs (Рис. 33).

4.2.8. Анализ возможных механизмов влияния AgNPs на гриппозную инфекцию

Совокупность представленных данных можно трактовать в пользу предположения, что дефицит церулоплазминовой меди, вызванный обработкой AgNPs, является причиной снижения летальности мышей, зараженных вирусом SA в дозе 10 ЛД₅₀. Однако, так как повышение выживаемости связано со снижением развития вирусной пневмонии и/или подавления развития цитокинового шторма, нельзя исключить связи между этими событиями. В пилотных экспериментах следующей части работы было проверено: (1) может ли серебро, аккумулированное в легких Ag-мышей, подавлять рост бактерий, которые могли бы участвовать в развитие пневмоний. (2) теряет ли Ag-ЦП способность индуцировать апоптоз у нейтрофилов; (3) изменен ли профиль цитокинов в сыворотке крови Ag-мышей, зараженных вирусом SA.

4.2.8.1. Сравнительный анализ микробиоты, развивающихся в легких мышей, зараженных вирусом SA после обработки AgNPs

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 представлены на рисунке 37. Они показывают, что ни инъекции новых порций AgNPs, ни серебро модифицированных наночастиц не влияли на общую бактериальную обсеменённость легких мышей.

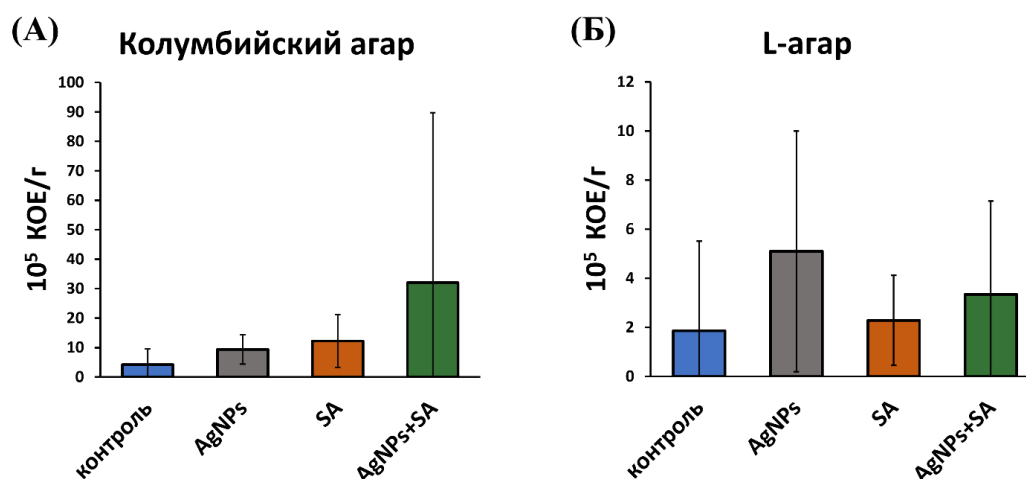


Рисунок 37. Титр бактерий в легких мышей зараженных вирусом SA после обработки AgNPs. Статистическая обработка данных проводилась при помощи двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием апостериорного теста Тьюки для множественных сравнений $*P < 0,05$.

Также мы попытались идентифицировать бактериальные клоны в каждой группе, чтобы оценить, изменяется ли их профиль в легких. Оказалось, что клоны, которые доминировали в контрольной группе, были доминирующими во всех других группах (Табл. 5). Однако из-за низкой достоверности результатов теста в контрольной группе (только один клон с достоверностью более 0,80) сделать однозначный вывод об абсолютном отсутствии изменений в бактериальном профиле затруднительно. В то же время полученные результаты позволяют однозначно заключить, что противовирусный эффект AgNPs не является результатом их прямого антибактериального воздействия на микробиом легких.

Таблица 5. Клоны бактерий, обнаруженные в легких мышей тестируемых групп на шестой день после заражения вирусом SA

Контроль	Д ¹	AgNPs	Д ¹	SA	Д ¹	AgNPs+SA	Д ¹
Haemophilus haemolyticus	0,8	Haemophilus haemolyticus	0,81	Haemophilus haemolyticus	0,81	Haemophilus haemolyticus	0,81
Lactococcus garvieae	0,56	Lactococcus garvieae	0,77	Lactococcus garvieae	0,48	Lactobacillus johnsoni	0,68
Streptococcus sp	0,49	Streptococcus hyointestinalis	0,86	Streptococcus hyointestinalis	0,88	Streptococcus hyointestinalis	0,87
Mycobacterium tuberculosis	0,48	Avibacterium avium	0,81	Proteus mirabilis	0,89	Haemophilus influenzae	0,81
		Neisseria elongata	0,82			Streptococcus oralis	0,46
						Rodentibacter pneumotropicus	0,84

Д¹: Достоверность теста

4.2.8.2. Сравнительный анализ способности холо-ЦП и Ag-ЦП индуцировать апоптоз лейкоцитов

Известно, что холо-ЦП вызывает апоптоз нейтрофилов, однако, ни его фрагменты, ни денатурированные формы, не обладают этим свойством [101]. Так как пространственная структура Ag-ЦП нарушена и близка к расплавленной глобуле [32], была проверена способность Ag-ЦП индуцировать апоптоз нейтрофилов. Для этого холо-ЦП и Ag-ЦП были выделены из сыворотки крови интактных мышей и мышей, которым вводили AgNPs в течение 7 дней. При получении препаратов Ag-ЦП и холо-ЦП использовали комбинацию трех хроматографий: ионообменной, аффинной и эксклюзионной, которые применяли в указанной последовательности. Обогащение фракций белками цели в ходе хроматографирования контролировали методом электрофореза в ПААГ, визуализацию белков в котором осуществляли с помощью окрашивания Кумасси синим в сравнении с Вестерн-блоттингом с моновалентными поликлональными антителами к ЦП. Результаты показывают, что после гель-фильтрационной хроматографии основным содержанием в образцах является белок ЦП (Рис. 38). Отношение $A_{610/280}$ для холо-ЦП составило 0,0469.

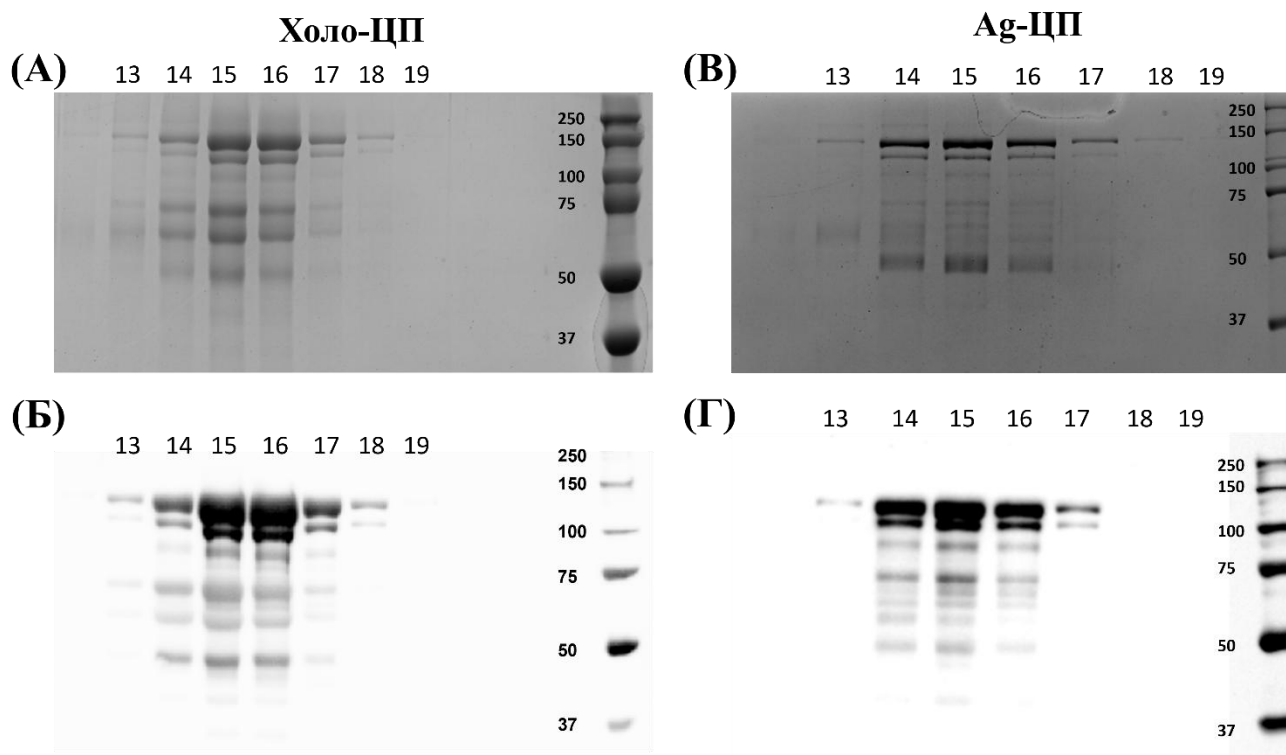


Рисунок 38. Оценка чистоты полученных препаратов холо-ЦП и Ag-ЦП методом электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях (**А, В**) и методом иммуноблотинга (**Б, Г**).. Фракции холо-ЦП (**А**) и Ag-ЦП (**В**): гели окрашены Кумасси синим; фракции холо-ЦП (**Б**) и Ag-ЦП (**Г**): иммунореактивные зоны выявлены с помощью антител к ЦП и визуализированы, как описано в методах.

Лейкоциты выделяли из крови intactных мышей, инкубировали с высокоочищенными препаратами холо-ЦП и Ag-ЦП в двух различных концентрациях и с двумя периодами инкубации. После инкубации из каждого образца экстрагировали ДНК и фракционировали ее с помощью горизонтального электрофореза в присутствии бромистого этидия. Холо-ЦП в этих условиях вызывает фрагментацию ДНК во всех образцах (Рис. 39: 3, 5, 7, 9), в то время как Ag-ЦП вызывает фрагментацию ДНК только после длительного периода инкубации с высокой концентрацией полипептида (Рис. 39: 2, 4, 6, 8).

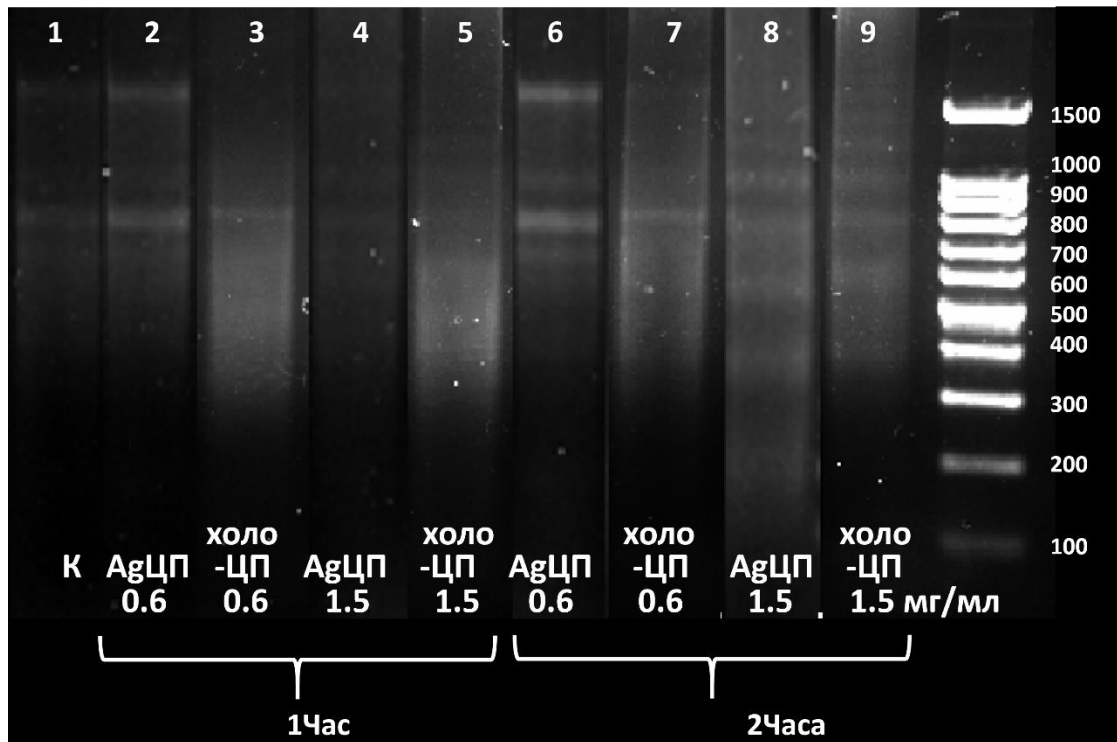


Рисунок 39. Фрагментация ДНК после инкубации с холо-ЦП и Ag-ЦП. Инкубация в течение 1 часа: дорожки со 2 по 5; и в течение двух часов: дорожки с 6 по 9. Инкубация с Ag-ЦП: дорожки 2, 4, 6, и 8; и инкубация с холо-ЦП: дорожки 3, 5, 7, и 9.

Таким образом, версия, что природа противовирусной активности AgNPs является утрата способности Ag-ЦП индуцировать апоптоз нейтрофилов, подтверждена экспериментально.

4.2.8.3. Влияние AgNPs на уровень интерлейкинов в сыворотке крови мышей, зараженных вирусом SA

Так как подавление апоптоза может быть одной из причин изменения уровня интерлейкинов в сыворотке мышей, мы допускаем, что сдвиг их уровней может быть зарегистрирован. Руководствуясь тем, что ключевым изменением при обработке AgNPs является инверсия холо-ЦП в Ag-ЦП, мы измерили концентрацию двух IL: IL6, который участвует в регуляции транскрипции гена ЦП благодаря трем активным *цис*-элементам в области от -800 до -1000 пн [78]; и IL2, который, по существующим данным, не имеет своего *цис*-элемента в промоторной зоне гена ЦП и не отвечает на низкий уровень статуса меди [10]. Результаты измерения концентрации IL2 и IL 6 представлены на рисунке (Рис. 40). Данные показывают, что порознь ни введение AgNPs, ни заражение вирусом SA не

оказывают влияния ни на концентрацию IL2 (Рис. 40А), ни на концентрацию IL6 (Рис. 40Б). Однако концентрация IL6 повышается у мышей, зараженных вирусом SA и инъектированных AgNPs (Рис. 40Б).

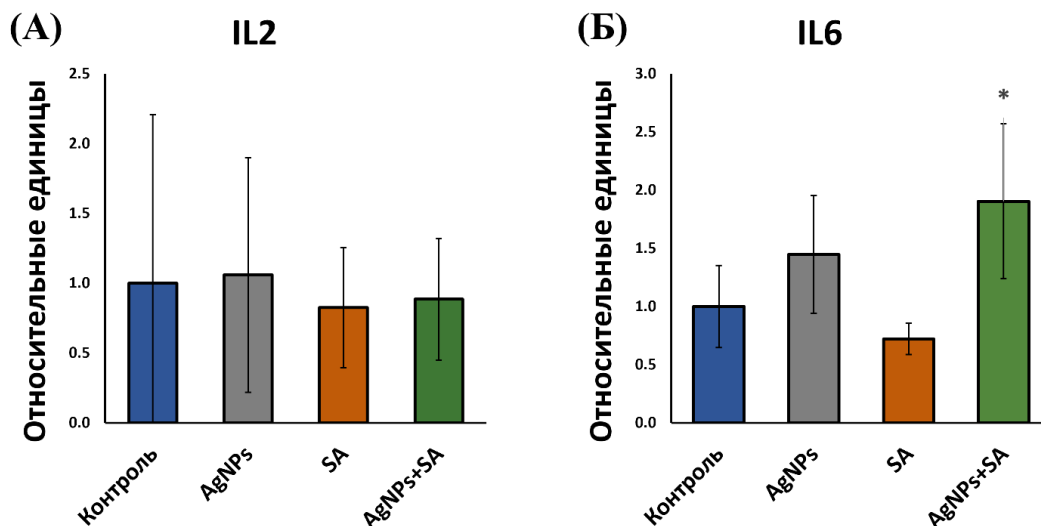


Рисунок 40: Уровни IL 2 и 6 в сыворотках крови тестируемых мышей. IL 2 (А), IL 6 (Б). Статистическая обработка данных проводилась при помощи двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием апостериорного теста Тьюки для множественных сравнений $*P < 0,05$.

Поскольку IL-6 играет противогриппозную роль во время инфекции, защищая нейтрофилы от гибели, вызванной вирусом гриппа, а его дефицит ухудшает присутствие нейтрофилов в легких и выведение вируса гриппа [97], мы предполагаем, что повышение уровня IL-6 является одним из механизмов, объясняющих защитную роль AgNPs против вирусной инфекции гриппа.

4.2.9. Оценка перспективы использовать AgNPs в качестве противовирусного препарата непрямого действия

Чтобы изучить возможность использовать AgNPs в качестве средства для лечения гриппозной инфекции, мышам обработали AgNPs по двум различным схемам, при этом концентрация AgNPs была снижена до 0,2 мг AgNPs на 1 кг массы тела (Рис. 41). По схеме 1, которая была использована на предыдущих этапах исследования, AgNPs начинали вводить за 4 дня до заражения вирусом и продолжали введения до конца эксперимента. По схеме 2 мышам не вводили AgNPs до заражения вирусом, а начинали их вводить только после заражения и

продолжали введения до конца эксперимента. Мышей заражали 10 ЛД₅₀ вирусом SA.

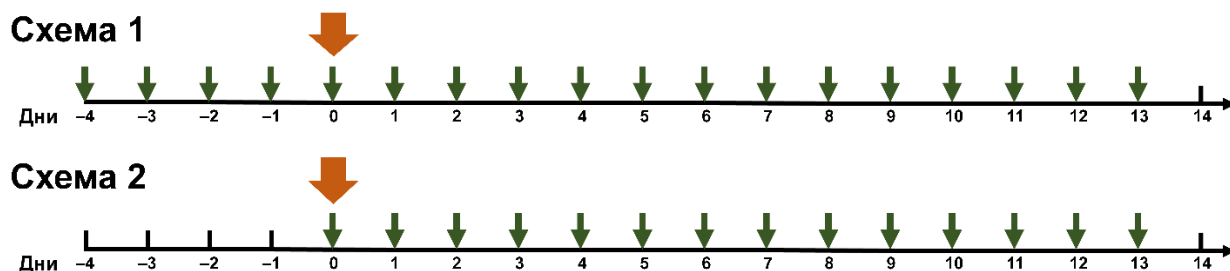


Рисунок 41. Дизайн эксперимента, позволяющего установить способность AgNPs эффективно подавлять вирусную инфекцию. Зелёная стрелка – внутрибрюшинное введение AgNPs. Оранжевая стрелка – заражение вирусом SA.

Для оценки влияния AgNPs на летальность мышей от пневмонии наблюдение осуществляли в течение 14 дней после заражения ($n = 10$). 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. 42).

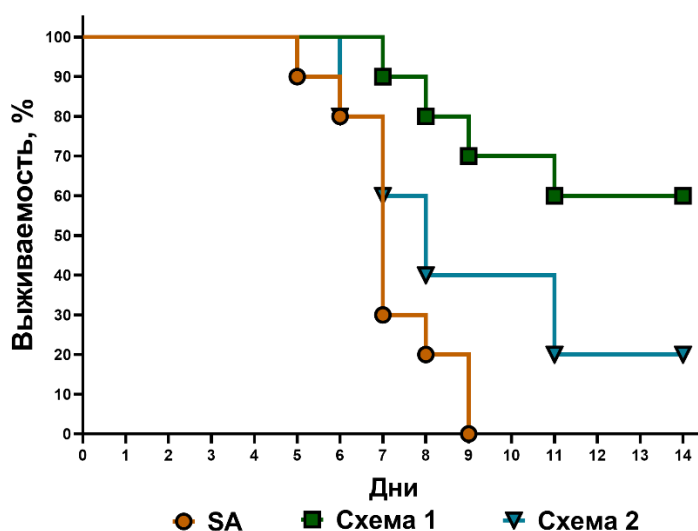


Рисунок 42. Влияние AgNPs на патогенность вируса гриппа. Для количественной оценки выживаемости использовали критерий Log-rank (Mantel-Cox), $P = 0.0005$, $P = 0.0408$ для схем 1 и 2, соответственно.

У пяти мышей из каждой группы, обработанных 0.2 мг AgNPs на 1 кг массы тела, на третий день после заражения, были взяты образцы сыворотки крови, в которых определили показатели статуса меди. Данные демонстрируют, что разница в показателях статуса меди коррелирует с летальностью мышей (Рис. 43А).

Введение AgNPs по схеме 2 снижало оксидазную активность ЦП и содержание меди в сыворотке крови, однако введение AgNPs по схеме 1 оказывало более выраженное влияние на эти показатели (Рис. 43А и Б). В дополнение к этому, концентрация серебра в сыворотке крови мышей, получавших AgNPs по схеме 2, была почти вдвое ниже концентрации серебра у мышей, получавших AgNPs по схеме 1. (Рис. 43В).

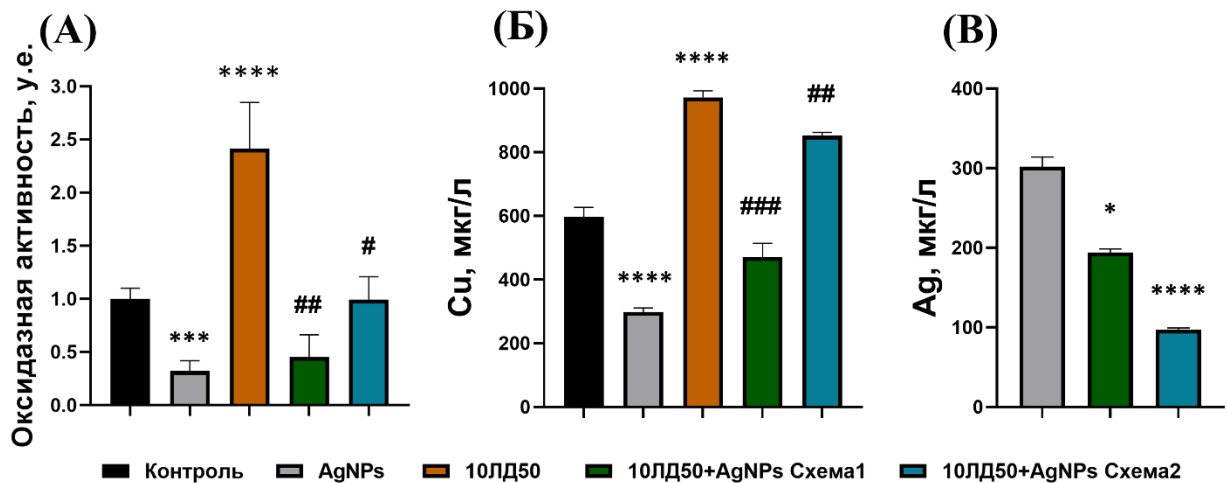


Рисунок 43. Влияние AgNPs на статус меди мышей, зараженных вирусом SA дозой 10ЛД₅₀. Оксидазная активность ЦП (А); Концентрации меди в сыворотке крови (Б); Концентрация серебра в сыворотке крови (В). Статистическая обработка данных проводилась при помощи двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с 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 не прямого действия [39].

5. 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. Только штамм вируса SA проявил высокое сходство с фенотипом модельного штамма PR8 (*ts/non-ts* и *ca/non-ca*). Вирус SA без предварительной адаптации обладает способностью заражать лабораторных животных, эффективно размножаться в легких и демонстрирует патогенность сходную с модельным штаммом PR8 (Рис. 19-22). Высокая патогенность вируса SA, возможно, 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 (Рис. 16, Табл. 3). Сравнение этого штамма с модельным штаммом PR8 показывает, что штамм вируса SA можно использовать для оценки потенциальных противовирусных препаратов.

Основная часть работы выполнена с использованием охарактеризованных AgNPs и выбранного модельного штамма вируса SA. Тестирование AgNPs на способность повышать выживаемость мышей, зараженных вирусом SA, демонстрирует их высокую эффективность (Рис. 29).

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 наступления равновесия между поступлением и выведением серебра, а также определением времени его клиренса после отмены инъекций наночастиц. Параллельно с легкими, за статусом серебра и меди следили в кровотоке и в печени. В кровотоке, помимо концентрации металлов, измеряли концентрацию белка ЦП и его энзиматическую активность. В качестве главного критерия снижения

показателей статуса меди использовали уровень оксидазной активности, то есть концентрацию холо-ЦП. В результате был разработан протокол обработки мышей AgNPs, согласно которому для достижения снижения статуса меди в крови достаточно внутрибрюшинного введения AgNPs один раз в сутки в течение четырех дней. Чтобы поддерживать низкий уровень оксидазного ЦП после заражения ВГА и в течение гриппозной инфекции, необходимо продолжать ежедневные инъекции наночастиц. Концентрация AgNPs в 10 раз ниже субтоксической (2 мг на 1 кг массы тела) эффективна и не токсична при применении в течение 18 суток. Протокол основывается на следующих результатах.

1. После однократной инъекции AgNPs пик содержания серебра, включенного в ЦП, достигается через четыре часа, концентрация серебра снижается к концу суток на 50% (Рис. 25).

2. Ежедневные внутрибрюшинные введения AgNPs в течение 5 дней приводят к полному замещению холо-ЦП Ag-ЦП, что выражается в исчезновении оксидазной активности, снижении общей концентрации меди примерно на 60% и появлению серебра, ассоциированного с ЦП. Концентрация иммунореактивного ЦП не меняется в течение эксперимента. Через неделю после отмены инъекций в кровотоке обнаруживается 10% серебра, которое, вероятно, относится к серебру, освобождаемому клетками различных органов (Рис. 25).

3. К клеткам легких серебро наночастиц доставляет Ag-ЦП только через 6–8 часов после инъекции AgNPs. При хроническом введении в печени концентрация серебра увеличивается в пять раз в течение первых четырех дней, затем выходит на плато. В легких за это же время концентрация серебра повышается в 2 раза, при этом она ниже почти в 30 раз по сравнению с печенью (Рис. 26). Важно отметить, что в отличие от печени, в которой AgNPs не влияют на экспрессию генов метаболизма меди (Рис. 27), в легких дефицит холо-ЦП вызывает повышение экспрессии гена *Ctrl* (импортер меди), а также генов пар (купроэнзим / Cu-шаперон, доставляющий медь для него): *Sod1/Ccs* и *Cp/Atox1*. Увеличивается также экспрессия гена прионового белка, роль которого в метаболизме меди не ясна, и незначительно растет активность гена метионина (Рис. 28). К тому же серебро

наночастиц, доставленное Ag-ЦП к клеткам легких, включается в ГФИ-ЦП, что приводит к потере им оксидазной активности (Рис. 36).

Таким образом, применение разработанного протокола позволяет изучить влияние дефицита биоактивной меди как на репродукцию ВГА в клетках легких, так и ответ организма на гриппозную инфекцию.

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, являющихся критичными для инициации 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. Стратегии и хозяина, и вируса направлены на метаболизм меди. 15-кратное повышение активности гена *MT* отражает участие металлотионеина в стресс-ответе, виру-индуцированным повышением АФК (Рис. 33).

Обработка AgNPs восстанавливает активность генов *Ctrl* и *Sod1* на всех уровнях экспрессии: производство мРНК, содержание иммунореактивных полипептидов и ферментативная активность (Рис. 33-35). В то же время наночастицы противодействуют действию вируса, который повышает активность про-вирусных генов: *Atp7a*, *Cp/GPI-Cp*, *Prnp* и *MT*.

При этом у мышей с низкими показателями статуса меди, летальность, вызванная гриппозной инфекцией, падает от 100% до 30%. Может показаться, 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, и они являются маркером неблагоприятного течения инфекции, а *in vitro* белки транспорта меди

необходимы для репродукции ВГА, простое снижение метаболизма меди не ведет к подавлению репродукции вируса в легких. Поиск звена, ответственного за AgNP-индуцированное снижение летальности, показало, что низкий статус меди, характеризующийся тем, что в крови Ag-мышей отсутствует холо-ЦП, но 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 антивирусного препарата непрямого действия.

6. ВЫВОДЫ

1. Не адаптированный к мышам штамм ВГА A/South Africa/3626/2013 (H1N1)pdm09 (SA) является модельным штаммом для заражения мышей, и его высокая патогенность обусловлена тремя штамм-специфическими заменами в полимеразном комплексе.

2. Донором меди/серебра для клеток легкого является ЦП, и, в отличие от печени, введение AgNPs вызывает повышение активности генов метаболизма меди.

3. Ежедневное внутрибрюшинное введение AgNPs снижает летальность мышей, вызванную гриппозной инфекцией, но не подавляет репродукцию ВГА и не влияет на микрофлору в 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 первых этапах реализации стратегии ВГА.

6. Замещение холо-ЦП Ag-ЦП защищает нейтрофилы мышей, от апоптоза.

7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

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)
non-ts 1	A/New Caledonia/20/99 (H1N1)
Ts1	A/Florida/3/06 (H1N1)
AgNPs	Наночастицы серебра
ATP7B	Медь-транспортная АТФаза 7B
ATP7A	Медь-транспортная АТФаза 7A
ca	Холодоадаптированный фенотип ВГА
CCS	Су-шаперон, доставляющий медь для СОД1
Cp	Ген церулоплазмينا
CTR1	Высокоаффинный транспортер меди 1
DTT	Дитиотреитол
EDTA	Этилендиаминтетрауксусная кислота

NA	Нейраминидаза
PA	Кислый белок полимеразного комплекса
PB1	Основной белок 1 полимеразного комплекса
PB2	Основной белок 2 полимеразного комплекса
PBS	Фосфатно-солевой буфер
PBST	PBS, 0.1% Tween-20
Prnp	Ген прионового белка
PrP	Прионовый белок
SOD1	Ген цитозольной супероксиддисмутазы
ts	Термочувствительный фенотип ВГА
WT	Дикий тип
АЛТ	Аланинаминотрансминазы
АСТ	Аспартатаминотрансферазы
АТОХ1	Антиоксидант 1
АФК	Активные формы кислорода
ВГА	Вирус гриппа А
ГФИ	Гликозилфосфатидил инозитоловый якорь
ЖКТ	Желудочно-кишечный тракт
ИАЖ	Инфекционная аллантоисная жидкость
ЛД ₅₀	Летальная доза для 50% испытуемых
МИД ₅₀	Инфицирующая доза для 50% мышей
МСМ	Метаболическая система меди
НА	Гемагглютинин
ПААГ	Полиакриламидный гель
ПСМ	Показатели статуса меди
СОД1	Цитозольная супероксиддисмутаза
ТСМ	Транспортная система меди
ЦП	Белок церулоплазмينا
ЭИД ₅₀	Инфицирующая доза для 50% куриных эмбрионов

8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A Mouse Model for the Evaluation of Pathogenesis and Immunity to Influenza A (H5N1) Viruses Isolated from Humans / X. Lu, T. M. Tumpey, T. Morken [et al.] // *Journal of Virology*. – 1999. – Vol. 73. – № 7. – P. 5903-5911.
2. A Systems Analysis Identifies a Feed-forward Inflammatory Circuit Leading to Lethal Influenza Infection / M. Brandes, F. Klauschen, S. Kuchen, R. N. Germain // *Cell*. – 2013. – Vol. 154. – № 1. – P. 197-212.
3. Aerosol Inoculation with a Sub-lethal Influenza Virus Leads to Exacerbated Morbidity and Pulmonary Disease Pathogenesis / J. H. Smith, T. Nagy, J. Barber [et al.] // *Viral Immunology*. – 2011. – Vol. 24. – № 2. – P. 131-142.
4. An updated systematic review of the role of host genetics in susceptibility to influenza / P. Horby, N. Y. Nguyen, S. J. Dunstan, J. Kenneth Baillie // *Influenza and Other Respiratory Viruses*. – 2013. – Vol. 7. – № Suppl 2. – P. 37-41.
5. Avian Influenza (H5N1) Viruses Isolated from Humans in Asia in 2004 Exhibit Increased Virulence in Mammals / T. R. Maines, X. H. Lu, S. M. Erb [et al.] // *Journal of Virology*. – 2005. – Vol. 79. – № 18. – P. 11788-11800.
6. Barnard, D. L. Animal models for the study of influenza pathogenesis and therapy / D. L. Barnard // *Antiviral Research*. – 2009. – Vol. 82. – № 2. – P. A110-A122.
7. Cirrhotic Liver of Liver Transplant Recipients Accumulate Silver and Co-Accumulate Copper / J. Poznański, D. Słodacki, B. Czarkowska-Pączek [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 4. – P. 1782.
8. Copper accumulation in senescent cells: Interplay between copper transporters and impaired autophagy / S. Masaldan, S. A. S. Clatworthy, C. Gamell [et al.] // *Redox Biology*. – 2018. – Vol. 16. – Copper accumulation in senescent cells. – P. 322-331.
9. CRISP-R/Cas9 Mediated Deletion of Copper Transport Genes CTR1 and DMT1 in NSCLC Cell Line H1299. Biological and Pharmacological Consequences / E. Y. Ilyechova, E. Bonaldi, I. A. Orlov [et al.] // *Cells*. – 2019. – Vol. 8. – № 4. – P. 322.
10. Do cytokines have any role in Wilson's disease? / M. K. Goyal, S. Sinha, S. A. Patil [et al.] // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2008. – Vol. 154. – № 1. – P. 74-79.
11. Effects of high temperature on pandemic and seasonal human influenza viral replication and infection-induced damage in primary human tracheal epithelial cell cultures / M. Yamaya, H. Nishimura, N. Lusamba Kalonji [et al.] // *Heliyon*. – 2019. – Vol. 5. – № 2. – P. e01149.

12. Expression Quantitative Trait Loci for Extreme Host Response to Influenza A in Pre-Collaborative Cross Mice / D. Bottomly, M. T. Ferris, L. D. Aicher [et al.] // *G3: Genes|Genomes|Genetics*. – 2012. – Vol. 2. – № 2. – P. 213-221.
13. Forterre, P. The virocell concept and environmental microbiology / P. Forterre // *The ISME Journal*. – 2013. – Vol. 7. – № 2. – P. 233-236.
14. Host Cell Copper Transporters CTR1 and ATP7A are important for Influenza A virus replication / J. C. Rupp, M. Locatelli, A. Grieser [et al.] // *Virology Journal*. – 2017. – Vol. 14. – № 1. – P. 11.
15. Host Genetic Background Strongly Influences the Response to Influenza A Virus Infections / B. Srivastava, P. Błażejewska, M. Heßmann [et al.] // *PLoS ONE*. – 2009. – Vol. 4. – № 3. – P. e4857.
16. Implication of Inflammatory Macrophages, Nuclear Receptors, and Interferon Regulatory Factors in Increased Virulence of Pandemic 2009 H1N1 Influenza A Virus after Host Adaptation / L. Josset, J. A. Belser, M. J. Pantin-Jackwood [et al.] // *Journal of Virology*. – 2012. – Vol. 86. – № 13. – P. 7192-7206.
17. Influenza Virus Receptor Specificity and Cell Tropism in Mouse and Human Airway Epithelial Cells / A. Ibricevic, A. Pekosz, M. J. Walter [et al.] // *Journal of Virology*. – 2006. – Vol. 80. – № 15. – P. 7469-7480.
18. Inhibition of Cellular Autophagy Deranges Dengue Virion Maturation / R. Mateo, C. M. Nagamine, J. Spagnolo [et al.] // *Journal of Virology*. – 2013. – Vol. 87. – № 3. – P. 1312-1321.
19. Kamal, R. P. Molecular Determinants of Influenza Virus Pathogenesis in Mice / R. P. Kamal, J. M. Katz, I. A. York // *Current topics in microbiology and immunology*. – 2014. – Vol. 385. – P. 243-274.
20. Kane, W. H. Blood Coagulation Factors V and VIII: Structural and Functional Similarities and Their Relationship to Hemorrhagic and Thrombotic Disorders / W. H. Kane, E. W. Davie // *Blood*. – 1988. – Vol. 71. – Blood Coagulation Factors V and VIII. – № 3. – P. 539-555.
21. Kiseleva, I. Current Opinion in LAIV: A Matter of Parent Virus Choice / I. Kiseleva // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – Current Opinion in LAIV. – № 12. – P. 6815.
22. Liao, C. Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles / C. Liao, Y. Li, S. C. Tjong // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20. – № 2. – P. 449.

23. Modeling Host Genetic Regulation of Influenza Pathogenesis in the Collaborative Cross / M. T. Ferris, D. L. Aylor, D. Bottomly [et al.] // PLoS Pathogens. – 2013. – Vol. 9. – № 2. – P. e1003196.
24. Non-Ceruloplasmin Copper Identifies a Subtype of Alzheimer's Disease (CuAD): Characterization of the Cognitive Profile and Case of a CuAD Patient Carrying an RGS7 Stop-Loss Variant / R. Squitti, C. Catalli, L. Gigante [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – Non-Ceruloplasmin Copper Identifies a Subtype of Alzheimer's Disease (CuAD). – № 7. – P. 6377.
25. Owen, J. A. Detection of ceruloplasmin after zone electrophoresis / J. A. Owen, H. Smith // Clinica Chimica Acta. – 1961. – Vol. 6. – № 3. – P. 441-444.
26. REED, L. J. A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS12 / L. J. REED, H. MUENCH // American Journal of Epidemiology. – 1938. – Vol. 27. – № 3. – P. 493-497.
27. Shope, R. E. THE INFECTION OF MICE WITH SWINE INFLUENZA VIRUS / R. E. Shope // The Journal of Experimental Medicine. – 1935. – Vol. 62. – № 4. – P. 561-572.
28. Skvortsov, A. N. Chemical background of silver nanoparticles interfering with mammalian copper metabolism / A. N. Skvortsov, E. Yu. Ilyechova, L. V. Puchkova // Journal of Hazardous Materials. – 2023. – Vol. 451. – P. 131093.
29. Stuart-Harris: A neurotropic strain of human influenza... - Google Scholar. – URL: https://scholar.google.com/scholar_lookup?journal=The%20Lancet&title=A%20neurotropic%20strain%20of%20human%20influenza%20virus&author=CH%20Stuart-Harris&volume=233&publication_year=1939&pages=497-499& (date accessed: 14.05.2025). – Text : electronic.
30. Stuart-Harris, C. H. A NEUROTROPIC STRAIN OF HUMAN INFLUENZA VIRUS : Originally published as Volume 1, Issue 6027 / C. H. Stuart-Harris // The Lancet. – 1939. – Vol. 233. – № 6027. – P. 497-499.
31. Thangavel, R. R. Animal models for influenza virus pathogenesis, transmission, and immunology : Analysis of Human Infectious Diseases in Murine Models / R. R. Thangavel, N. M. Bouvier // Journal of Immunological Methods. – 2014. – Vol. 410. – P. 60-79.
32. The effects of silver ions on copper metabolism in rats / E. Y. Ilyechova, A. N. Saveliev, A. N. Skvortsov [et al.] // Metallomics. – 2014. – Vol. 6. – № 10. – P. 1970-1987.
33. Transmembrane Topology of the Mammalian Slc11a2 Iron Transporter / M. Czachorowski, S. Lam-Yuk-Tseung, M. Cellier, P. Gros // Biochemistry. – 2009. – Vol. 48. – № 35. – P. 8422-8434.

34. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov, O. Golosova, M. Fursov, the UGENE team // *Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 28. – Unipro UGENE. – № 8. – P. 1166-1167.
35. Villoutreix, B. O. Structural investigation of the A domains of human blood coagulation factor V by molecular modeling / B. O. Villoutreix, B. Dahlbäck // *Protein Science*. – 1998. – Vol. 7. – № 6. – P. 1317-1325.
36. Wyde, P. R. Cellular Changes in Lungs of Mice Infected with Influenza Virus: Characterization of the Cytotoxic Responses / P. R. Wyde, T. R. Cate // *Infection and Immunity*. – 1978. – Vol. 22. – Cellular Changes in Lungs of Mice Infected with Influenza Virus. – № 2. – P. 423-429.
37. Zatulovskiy, E. Docking study on mammalian CTR1 copper importer motifs / E. Zatulovskiy, S. Samsonov, A. Skvortsov // *BMC Systems Biology*. – 2007. – Vol. 1. – № 1. – P. P54.
38. Zeng, L. Cellular prion protein (PrPC) and its role in stress responses / L. Zeng, W. Zou, G. Wang // *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. – 2015. – Vol. 8. – № 5. – P. 8042-8050.
39. 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.
40. Ilyechova, E. Y. The role of subcutaneous adipose tissue in supporting the copper balance in rats with a chronic deficiency in holo-ceruloplasmin / E. Y. Ilyechova, N. V. Tsymbalenko, L. V. Puchkova // *PLOS ONE*. – 2017. – Vol. 12. – № 4. – P. e0175214.
41. 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.
42. Influenza (seasonal). – URL: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)) (date accessed: 29.05.2025). – Text : electronic.
43. Kotuniak, R. Kinetics of Cu(II) complexation by ATCUN/NTS and related peptides: a gold mine of novel ideas for copper biology / R. Kotuniak, W. Bal // *Dalton Transactions*. – 2021. – Vol. 51. – Kinetics of Cu(II) complexation by ATCUN/NTS and related peptides. – № 1. – P. 14-26.
44. Linder, M. C. Turnover and excretion of copper in rats as measured with ^{67}Cu / M. C. Linder, M. Roboz. – Text : electronic // *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. – 1986. – URL: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.1986.251.5.E551> (date accessed: 19.05.2025).

45. Martinez, M. M. Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques / M. M. Martinez, R. D. Reif, D. Pappas // *Analytical Methods*. – 2010. – Vol. 2. – Detection of apoptosis. – № 8. – P. 996-1004.
46. Meineke, R. Influenza Virus Infections and Cellular Kinases / R. Meineke, G. F. Rimmelzwaan, H. Elbahesh // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11. – № 2. – P. 171.
47. 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.
48. 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 [et al.] // *Environmental Science: Nano*. – 2022. – Vol. 9. – № 9. – P. 3581-3598.
49. Structure of influenza A polymerase bound to the viral RNA promoter / A. Pflug, D. Guigligay, S. Reich, S. Cusack // *Nature*. – 2014. – Vol. 516. – № 7531. – P. 355-360.
50. The N-terminal 14-mer model peptide of human Ctr1 can collect Cu(II) from albumin. Implications for copper uptake by Ctr1 / E. Stefaniak, D. Płonka, S. C. Drew [et al.] // *Metallomics*. – 2018. – Vol. 10. – № 12. – P. 1723-1727.
51. 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.
52. A novel role for copper in Ras/mitogen-activated protein kinase signaling / M. L. Turski, D. C. Brady, H. J. Kim [et al.] // *Molecular and Cellular Biology*. – 2012. – Vol. 32. – № 7. – P. 1284-1295.
53. Active-site maturation and activity of the copper-radical oxidase GlxA are governed by a tryptophan residue / A. K. Chaplin, D. A. Svistunenko, M. A. Hough [et al.] // *The Biochemical Journal*. – 2017. – Vol. 474. – № 5. – P. 809-825.
54. Advances in the understanding of mammalian copper transporters / Y. Wang, V. Hodgkinson, S. Zhu [et al.] // *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*. – 2011. – Vol. 2. – № 2. – P. 129-137.
55. Alteration of copper-zinc superoxide dismutase 1 expression by influenza A virus is correlated with virus replication / C.-W. Pyo, N. Shin, K. I. Jung [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2014. – Vol. 450. – № 1. – P. 711-716.
56. Antiviral activity of silver nanoparticles against the influenza A virus / K. Naumenko, S. Zahorodnia, C. V. Pop, N. Rizun // *Journal of Virus Eradication*. – 2023. – Vol. 9. – № 2. – P. 100330.

57. Avian influenza virus isolates from wild birds replicate and cause disease in a mouse model of infection / E. A. Driskell, C. A. Jones, D. E. Stallknecht [et al.] // *Virology*. – 2010. – Vol. 399. – № 2. – P. 280-289.
58. Bäck, N. PAM: diverse roles in neuroendocrine cells, cardiomyocytes, and green algae / N. Bäck, R. E. Mains, B. A. Eipper // *The FEBS journal*. – 2022. – Vol. 289. – PAM. – № 15. – P. 4470-4496.
59. Baker, Z. N. The mitochondrion: a central architect of copper homeostasis / Z. N. Baker, P. A. Cobine, S. C. Leary // *Metallomics: Integrated Biometal Science*. – 2017. – Vol. 9. – The mitochondrion. – № 11. – P. 1501-1512.
60. Banks, C. J. Mechanisms of SOD1 regulation by post-translational modifications / C. J. Banks, J. L. Andersen // *Redox Biology*. – 2019. – Vol. 26. – P. 101270.
61. Bartuzi, P. Tuning NF- κ B activity: a touch of COMMD proteins / P. Bartuzi, M. H. Hofker, B. van de Sluis // *Biochimica Et Biophysica Acta*. – 2013. – Vol. 1832. – Tuning NF- κ B activity. – № 12. – P. 2315-2321.
62. Bhattacharjee, A. Cellular copper homeostasis: current concepts on its interplay with glutathione homeostasis and its implication in physiology and human diseases / A. Bhattacharjee, K. Chakraborty, A. Shukla // *Metallomics: Integrated Biometal Science*. – 2017. – Vol. 9. – Cellular copper homeostasis. – № 10. – P. 1376-1388.
63. Bielli, P. Structure to function relationships in ceruloplasmin: a “moonlighting” protein / P. Bielli, L. Calabrese // *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. – 2002. – Vol. 59. – Structure to function relationships in ceruloplasmin. – № 9. – P. 1413-1427.
64. Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1 / J. Lee, M. M. O. Peña, Y. Nose, D. J. Thiele // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277. – № 6. – P. 4380-4387.
65. Biosynthesis of silver nanoparticles / S. Poulouse, T. Panda, P. P. Nair, T. Théodore // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. – 2014. – Vol. 14. – № 2. – P. 2038-2049.
66. Biosynthesized Silver Nanoparticles for Cancer Therapy and In Vivo Bioimaging / S. Haque, C. C. Norbert, R. Acharyya [et al.] // *Cancers*. – 2021. – Vol. 13. – № 23. – P. 6114.
67. Bousquet-Moore, D. Peptidylglycine α -amidating monooxygenase and copper: a gene-nutrient interaction critical to nervous system function / D. Bousquet-Moore, R. E. Mains, B. A. Eipper // *Journal of Neuroscience Research*. – 2010. – Vol. 88. – Peptidylglycine α -amidating monooxygenase and copper. – № 12. – P. 2535-2545.
68. Breeding stock-specific variation in peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase messenger ribonucleic acid splicing in rat pituitary / G. D. Ciccotosto, T.

A. Hand, R. E. Mains, B. A. Eipper // *Endocrinology*. – 2000. – Vol. 141. – № 2. – P. 476-486.

69. Calvo, J. Copper metallothioneins / J. Calvo, H. Jung, G. Meloni // *IUBMB life*. – 2017. – Vol. 69. – № 4. – P. 236-245.

70. Cathepsin Protease Controls Copper and Cisplatin Accumulation via Cleavage of the Ctr1 Metal-binding Ectodomain / H. Öhrvik, B. Logeman, B. Turk [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2016. – Vol. 291. – № 27. – P. 13905-13916.

71. Cellular multitasking: the dual role of human Cu-ATPases in cofactor delivery and intracellular copper balance / S. Lutsenko, A. Gupta, J. L. Burkhead, V. Zuzel // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2008. – Vol. 476. – Cellular multitasking. – № 1. – P. 22-32.

72. Ceruloplasmin and hephaestin jointly protect the exocrine pancreas against oxidative damage by facilitating iron efflux / M. Chen, J. Zheng, G. Liu [et al.] // *Redox Biology*. – 2018. – Vol. 17. – P. 432-439.

73. Ceruloplasmin, copper ions, and angiogenesis / K. S. Raju, G. Alessandri, M. Ziche, P. M. Gullino // *Journal of the National Cancer Institute*. – 1982. – Vol. 69. – № 5. – P. 1183-1188.

74. Ceruloplasmin expression by human peripheral blood lymphocytes: a new link between immunity and iron metabolism / J. Banha, L. Marques, R. Oliveira [et al.] // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2008. – Vol. 44. – Ceruloplasmin expression by human peripheral blood lymphocytes. – № 3. – P. 483-492.

75. Ceruloplasmin gene expression profile changes in the rat mammary gland during pregnancy, lactation and involution / N. A. Platonova, I. A. Orlov, S. A. Klotchenko [et al.] // *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*. – 2017. – Vol. 43. – P. 126-134.

76. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus / T. M. Tumpey, C. F. Basler, P. V. Aguilar [et al.] // *Science (New York, N.Y.)*. – 2005. – Vol. 310. – № 5745. – P. 77-80.

77. Comparative study of some characteristics of influenza virus A/PR8/34 (H1N1) cultivated on chorioallantoic membrane fragments in the presence of ceruloplasmin or of parainfluenza type I (Sendai) virus / E. Tomas, I. Samuel, A. Popescu, N. Cajal // *Virologie*. – 1983. – Vol. 34. – № 4. – P. 295-301.

78. Copper chelation and interleukin-6 proinflammatory cytokine effects on expression of different proteins involved in iron metabolism in HepG2 cell line / L. M. Di Bella, R. Alampi, F. Biundo [et al.] // *BMC biochemistry*. – 2017. – Vol. 18. – № 1. – P. 1.

79. Copper depletion inhibits CoCl₂-induced aggressive phenotype of MCF-7 cells via downregulation of HIF-1 and inhibition of Snail/Twist-mediated epithelial-mesenchymal transition / S. Li, J. Zhang, H. Yang [et al.] // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – P. 12410.
80. Copper is required for oncogenic BRAF signalling and tumorigenesis / D. C. Brady, M. S. Crowe, M. L. Turski [et al.] // *Nature*. – 2014. – Vol. 509. – № 7501. – P. 492-496.
81. Copper is taken up efficiently from albumin and alpha2-macroglobulin by cultured human cells by more than one mechanism / M. Moriya, Y.-H. Ho, A. Grana [et al.] // *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. – 2008. – Vol. 295. – № 3. – P. C708-721.
82. Copper metabolism in cell death and autophagy / Q. Xue, R. Kang, D. J. Klionsky [et al.] // *Autophagy*. – 2023. – Vol. 19. – № 8. – P. 2175-2195.
83. Copper Metabolism of Newborns Is Adapted to Milk Ceruloplasmin as a Nutritive Source of Copper: Overview of the Current Data / L. V. Puchkova, P. S. Babich, Y. A. Zatulovskaia [et al.] // *Nutrients*. – 2018. – Vol. 10. – Copper Metabolism of Newborns Is Adapted to Milk Ceruloplasmin as a Nutritive Source of Copper. – № 11. – P. 1591.
84. Copper regulates cyclic-AMP-dependent lipolysis / L. Krishnamoorthy, J. A. Cotruvo, J. Chan [et al.] // *Nature Chemical Biology*. – 2016. – Vol. 12. – № 8. – P. 586-592.
85. Copper Sources for Sod1 Activation / S. D. Boyd, M. S. Ullrich, A. Skopp, D. D. Winkler // *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. – 2020. – Vol. 9. – № 6. – P. 500.
86. Copper(II) import and reduction are dependent on His-Met clusters in the extracellular amino terminus of human copper transporter-1 / S. Kar, S. Sen, S. Maji [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2022. – Vol. 298. – № 3. – P. 101631.
87. Copper-mediated thiol potentiation and mutagenesis-guided modeling suggest a highly conserved copper-binding motif in human OR2M3 / F. Haag, L. Ahmed, K. Reiss [et al.] // *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. – 2020. – Vol. 77. – № 11. – P. 2157-2179.
88. Cros, J. F. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses / J. F. Cros, P. Palese // *Virus Research*. – 2003. – Vol. 95. – Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus. – № 1-2. – P. 3-12.
89. Ctr1 Intracellular Loop Is Involved in the Copper Transfer Mechanism to the Atox1 Metallochaperone / A. R. Levy, M. Nissim, N. Mendelman [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry. B*. – 2016. – Vol. 120. – № 48. – P. 12334-12345.

90. Curnock, R. Mammalian copper homeostasis requires retromer-dependent recycling of the high-affinity copper transporter 1 / R. Curnock, P. J. Cullen // *Journal of Cell Science*. – 2020. – Vol. 133. – № 16. – P. jcs249201.
91. Cytotoxicity and Genotoxicity of Biogenic Silver Nanoparticles in A549 and BEAS-2B Cell Lines / M. Muhamad, N. Ab Rahim, W. A. Wan Omar, N. N. S. Nik Mohamed Kamal // *Bioinorganic Chemistry and Applications*. – 2022. – Vol. 2022. – P. 8546079.
92. De Vlugt, C. Insight into Influenza: A Virus Cap-Snatching / C. De Vlugt, D. Sikora, M. Pelchat // *Viruses*. – 2018. – Vol. 10. – Insight into Influenza. – № 11. – P. 641.
93. DeFranco, J. P. The Evolution of Experimental Rodent Models for Prion Diseases / J. P. DeFranco, G. C. Telling // *Journal of Neurochemistry*. – 2025. – Vol. 169. – № 3. – P. e70039.
94. Dennerlein, S. Cytochrome c oxidase biogenesis - from translation to early assembly of the core subunit COX1 / S. Dennerlein, P. Rehling, R. Richter-Dennerlein // *FEBS letters*. – 2023. – Vol. 597. – № 12. – P. 1569-1578.
95. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate / K. Loeschner, N. Hadrup, K. Qvortrup [et al.] // *Particle and Fibre Toxicology*. – 2011. – Vol. 8. – P. 18.
96. Effect of sub-dermal exposure of silver nanoparticles on hepatic, renal and cardiac functions accompanying oxidative damage in male Wistar rats / J. O. Olugbodi, B. Lawal, G. Bako [et al.] // *Scientific Reports*. – 2023. – Vol. 13. – № 1. – P. 10539.
97. Essential role of IL-6 in protection against H1N1 influenza virus by promoting neutrophil survival in the lung / O. Dienz, J. G. Rud, S. M. Eaton [et al.] // *Mucosal Immunology*. – 2012. – Vol. 5. – № 3. – P. 258-266.
98. Evaluation of replication and pathogenicity of avian influenza a H7 subtype viruses in a mouse model / T. Joseph, J. McAuliffe, B. Lu [et al.] // *Journal of Virology*. – 2007. – Vol. 81. – № 19. – P. 10558-10566.
99. Evaluation of silver nanoparticles for the prevention of SARS-CoV-2 infection in health workers: In vitro and in vivo / H. Almanza-Reyes, S. Moreno, I. Plascencia-López [et al.] // *PloS One*. – 2021. – Vol. 16. – Evaluation of silver nanoparticles for the prevention of SARS-CoV-2 infection in health workers. – № 8. – P. e0256401.
100. Experimental switching of copper status in laboratory rodents / E. Ilyechova, A. Skvortsov, E. Zatulovsky [et al.] // *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*. – 2011. – Vol. 25. – № 1. – P. 27-35.

101. Fine Regulation of Neutrophil Oxidative Status and Apoptosis by Ceruloplasmin and Its Derivatives / E. A. Golenkina, G. M. Viryasova, S. I. Galkina [et al.] // *Cells*. – 2018. – Vol. 7. – № 1. – P. 8.
102. Fleming, R. E. Primary structure of rat ceruloplasmin and analysis of tissue-specific gene expression during development / R. E. Fleming, J. D. Gitlin // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1990. – Vol. 265. – № 13. – P. 7701-7707.
103. Fleming, R. E. Induction of ceruloplasmin gene expression in rat lung during inflammation and hyperoxia / R. E. Fleming, I. P. Whitman, J. D. Gitlin // *The American Journal of Physiology*. – 1991. – Vol. 260. – № 2 Pt 1. – P. L68-74.
104. Fortna, R. R. Glycosyl phosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is expressed by rat Sertoli cells and is concentrated in detergent-insoluble membrane fractions / R. R. Fortna, H. A. Watson, S. E. Nyquist // *Biology of Reproduction*. – 1999. – Vol. 61. – № 4. – P. 1042-1049.
105. Fukai, T. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases / T. Fukai, M. Ushio-Fukai // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2011. – Vol. 15. – Superoxide dismutases. – № 6. – P. 1583-1606.
106. Functional ionotropic glutamate receptors on peripheral axons and myelin / P. C. Christensen, N. C. Welch, C. Brideau, P. K. Stys // *Muscle & Nerve*. – 2016. – Vol. 54. – № 3. – P. 451-459.
107. Haller, O. The Mx GTPase family of interferon-induced antiviral proteins / O. Haller, S. Stertz, G. Kochs // *Microbes and Infection*. – 2007. – Vol. 9. – № 14-15. – P. 1636-1643.
108. Han, C.-X. The quantification of prion gene expression in sheep using real-time RT-PCR / C.-X. Han, H.-X. Liu, D.-M. Zhao // *Virus Genes*. – 2006. – Vol. 33. – № 3. – P. 359-364.
109. Hannoun, C. The evolving history of influenza viruses and influenza vaccines / C. Hannoun // *Expert Review of Vaccines*. – 2013. – Vol. 12. – № 9. – P. 1085-1094.
110. Harris, D. A. Trafficking, turnover and membrane topology of PrP / D. A. Harris // *British Medical Bulletin*. – 2003. – Vol. 66. – P. 71-85.
111. Heavy metals: toxicity and human health effects / K. Jomova, S. Y. Alomar, E. Nepovimova [et al.] // *Archives of Toxicology*. – 2025. – Vol. 99. – Heavy metals. – № 1. – P. 153-209.
112. High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory properties during acute influenza a infection / B. J. Van Lenten, A. C. Wagner, D. P. Nayak [et al.] // *Circulation*. – 2001. – Vol. 103. – № 18. – P. 2283-2288.

113. Holtzman, N. A. Studies on the rate of release and turnover of ceruloplasmin and apoceruloplasmin in rat plasma / N. A. Holtzman, B. M. Gaumnitz // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1970. – Vol. 245. – № 9. – P. 2354-2358.
114. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium / M. N. Matrosovich, T. Y. Matrosovich, T. Gray [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2004. – Vol. 101. – № 13. – P. 4620-4624.
115. Human plasma protein N-glycosylation / F. Clerc, K. R. Reiding, B. C. Jansen [et al.] // *Glycoconjugate Journal*. – 2016. – Vol. 33. – № 3. – P. 309-343.
116. Identification of methionine-rich clusters that regulate copper-stimulated endocytosis of the human Ctr1 copper transporter / Y. Guo, K. Smith, J. Lee [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279. – № 17. – P. 17428-17433.
117. Identification of zyklopen, a new member of the vertebrate multicopper ferroxidase family, and characterization in rodents and human cells / H. Chen, Z. K. Attieh, B. A. Syed [et al.] // *The Journal of Nutrition*. – 2010. – Vol. 140. – № 10. – P. 1728-1735.
118. Immune cells and hepatocytes express glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin at their cell surface / L. Marques, A. Auriac, A. Willemetz [et al.] // *Blood Cells, Molecules & Diseases*. – 2012. – Vol. 48. – № 2. – P. 110-120.
119. In Vitro Antiviral Activity of Cinnamomum cassia and Its Nanoparticles Against H7N3 Influenza A Virus / M. Fatima, N.-U.-S. S. Zaidi, D. Amraiz, F. Afzal // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2016. – Vol. 26. – № 1. – P. 151-159.
120. Influenza M2 protein regulates MAVS-mediated signaling pathway through interacting with MAVS and increasing ROS production / R. Wang, Y. Zhu, X. Lin [et al.] // *Autophagy*. – 2019. – Vol. 15. – № 7. – P. 1163-1181.
121. Inhibition of A/Human/Hubei/3/2005 (H3N2) influenza virus infection by silver nanoparticles in vitro and in vivo / D. Xiang, Y. Zheng, W. Duan [et al.] // *International Journal of Nanomedicine*. – 2013. – Vol. 8. – P. 4103-4113.
122. Inhibitory effects of silver nanoparticles on H1N1 influenza A virus in vitro / D. Xiang, Q. Chen, L. Pang, C. Zheng // *Journal of Virological Methods*. – 2011. – Vol. 178. – № 1-2. – P. 137-142.
123. Intermolecular transfer of copper ions from the CopC protein of *Pseudomonas syringae*. Crystal structures of fully loaded Cu(I)Cu(II) forms / L. Zhang, M. Koay, M. J. Maher [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2006. – Vol. 128. – № 17. – P. 5834-5850.
124. Jung, K. I. Influenza A virus-induced autophagy contributes to enhancement of virus infectivity by SOD1 downregulation in alveolar epithelial cells / K. I. Jung, C. W.

Pyo, S.-Y. Choi // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2018. – Vol. 498. – № 4. – P. 960-966.

125. Kaler, S. G. Inborn errors of copper metabolism / S. G. Kaler // Handbook of Clinical Neurology. – 2013. – Vol. 113. – P. 1745-1754.

126. Klinman, J. P. The copper-enzyme family of dopamine beta-monooxygenase and peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase: resolving the chemical pathway for substrate hydroxylation / J. P. Klinman // The Journal of Biological Chemistry. – 2006. – Vol. 281. – The copper-enzyme family of dopamine beta-monooxygenase and peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase. – № 6. – P. 3013-3016.

127. Knutson, M. D. Steap proteins: implications for iron and copper metabolism / M. D. Knutson // Nutrition Reviews. – 2007. – Vol. 65. – Steap proteins. – № 7. – P. 335-340.

128. Kosman, D. J. Multicopper oxidases: a workshop on copper coordination chemistry, electron transfer, and metallophysiology / D. J. Kosman // Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry. – 2010. – Vol. 15. – Multicopper oxidases. – № 1. – P. 15-28.

129. Kumar, A. Comparative Analysis of Commercial Colloidal Silver Products / A. Kumar, D. V. Goia // International Journal of Nanomedicine. – 2020. – Vol. 15. – P. 10425-10434.

130. Laczko, R. Lysyl Oxidase (LOX): Functional Contributions to Signaling Pathways / R. Laczko, K. Csiszar // Biomolecules. – 2020. – Vol. 10. – Lysyl Oxidase (LOX). – № 8. – P. 1093.

131. Laurell, A. B. Inhibitor capacity of some purified human serum proteins on hemagglutination by influenza virus / A. B. Laurell // Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica. – 1960. – Vol. 49. – P. 213-222.

132. Lee, J. Essential role for mammalian copper transporter Ctr1 in copper homeostasis and embryonic development / J. Lee, J. R. Prohaska, D. J. Thiele // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2001. – Vol. 98. – № 12. – P. 6842-6847.

133. Legname, G. Elucidating the function of the prion protein / G. Legname // PLoS pathogens. – 2017. – Vol. 13. – № 8. – P. e1006458.

134. Lindenmann, J. INHERITANCE OF RESISTANCE TO INFLUENZA VIRUS IN MICE / J. Lindenmann // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.). – 1964. – Vol. 116. – P. 506-509.

135. Local production of proteins in normal human bronchial secretion / S. Szabó, Z. Barbu, L. Lakatos [et al.] // *Respiration; International Review of Thoracic Diseases*. – 1980. – Vol. 39. – № 3. – P. 172-178.
136. Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein / G. S. Jackson, I. Murray, L. L. Hosszu [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2001. – Vol. 98. – № 15. – P. 8531-8535.
137. Loss of Memo, a novel FGFR regulator, results in reduced lifespan / B. Haenzi, O. Bonny, R. Masson [et al.] // *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. – 2014. – Vol. 28. – № 1. – P. 327-336.
138. LOXL2 Oxidizes Methylated TAF10 and Controls TFIID-Dependent Genes during Neural Progenitor Differentiation / A. Iturbide, L. Pascual-Reguant, L. Fargas [et al.] // *Molecular Cell*. – 2015. – Vol. 58. – № 5. – P. 755-766.
139. Luo, M. Influenza virus entry / M. Luo // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2012. – Vol. 726. – P. 201-221.
140. Lutsenko, S. Mammalian copper homeostasis: physiological roles and molecular mechanisms / S. Lutsenko, S. Roy, P. Tsvetkov // *Physiological Reviews*. – 2025. – Vol. 105. – Mammalian copper homeostasis. – № 1. – P. 441-491.
141. Lysyl Oxidase 3 Is a Dual-Specificity Enzyme Involved in STAT3 Deacetylation and Deacetylimination Modulation / L. Ma, C. Huang, X.-J. Wang [et al.] // *Molecular Cell*. – 2017. – Vol. 65. – № 2. – P. 296-309.
142. Lysyl oxidase propeptide promotes adipogenesis through inhibition of FGF-2 signaling / J. D. Griner, C. J. Rogers, M.-J. Zhu, M. Du // *Adipocyte*. – 2017. – Vol. 6. – № 1. – P. 12-19.
143. Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) oxidizes trimethylated lysine 4 in histone H3 / N. Herranz, N. Dave, A. Millanes-Romero [et al.] // *The FEBS journal*. – 2016. – Vol. 283. – № 23. – P. 4263-4273.
144. Magill, T. P. THE ACTION OF IMMUNE SERUM ON HUMAN INFLUENZA VIRUS IN VITRO / T. P. Magill, T. Francis // *The Journal of Experimental Medicine*. – 1937. – Vol. 65. – № 6. – P. 861-872.
145. Marklund, S. L. Ceruloplasmin, extracellular-superoxide dismutase, and scavenging of superoxide anion radicals / S. L. Marklund // *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*. – 1986. – Vol. 2. – № 4. – P. 255-260.
146. Marklund, S. L. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species / S. L. Marklund // *The Biochemical journal*. – 1984. – Vol. 222. – № 3. – P. 649-655.

147. Mechanism of Copper Uptake from Blood Plasma Ceruloplasmin by Mammalian Cells / D. Ramos, D. Mar, M. Ishida [et al.] // *PloS One*. – 2016. – Vol. 11. – № 3. – P. e0149516.
148. Memo is a copper-dependent redox protein with an essential role in migration and metastasis / G. MacDonald, I. Nalvarte, T. Smirnova [et al.] // *Science Signaling*. – 2014. – Vol. 7. – № 329. – P. ra56.
149. Memo1 binds reduced copper ions, interacts with copper chaperone Atox1, and protects against copper-mediated redox activity in vitro / X. Zhang, G. R. Walke, I. Horvath [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2022. – Vol. 119. – № 37. – P. e2206905119.
150. Methods of assessment of copper status in humans: a systematic review / L. J. Harvey, K. Ashton, L. Hooper [et al.] // *The American Journal of Clinical Nutrition*. – 2009. – Vol. 89. – Methods of assessment of copper status in humans. – № 6. – P. 2009S-2024S.
151. Miyata, N. Cell Death or Survival Against Oxidative Stress / N. Miyata, K. Okumoto, Y. Fujiki // *Sub-Cellular Biochemistry*. – 2018. – Vol. 89. – P. 463-471.
152. Molteni, C. G. Reactive oxygen and nitrogen species during viral infections / C. G. Molteni, N. Principi, S. Esposito // *Free Radical Research*. – 2014. – Vol. 48. – № 10. – P. 1163-1169.
153. Moran, L. K. Thiols in cellular redox signalling and control / L. K. Moran, J. M. Gutteridge, G. J. Quinlan // *Current Medicinal Chemistry*. – 2001. – Vol. 8. – № 7. – P. 763-772.
154. Mostad, E. J. Glycosylphosphatidylinositol-linked ceruloplasmin is expressed in multiple rodent organs and is lower following dietary copper deficiency / E. J. Mostad, J. R. Prohaska // *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.). – 2011. – Vol. 236. – № 3. – P. 298-308.
155. Nagamine, T. Significance of metallothionein expression in liver disease / T. Nagamine, K. Nakajima // *Current Pharmaceutical Biotechnology*. – 2013. – Vol. 14. – № 4. – P. 420-426.
156. Neurological manifestations of avian influenza viruses in mammals / T. Rowe, D. S. Cho, R. A. Bright [et al.] // *Avian Diseases*. – 2003. – Vol. 47. – № 3 Suppl. – P. 1122-1126.
157. Neuronal nitric oxide synthase interacts with Sp1 through the PDZ domain inhibiting Sp1-mediated copper-zinc superoxide dismutase expression / S. Baldelli, K. Aquilano, G. Rotilio, M. R. Ciriolo // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2011. – Vol. 43. – № 1. – P. 163-169.

158. New silver nanoparticles induce apoptosis-like process in *E. coli* and interfere with mammalian copper metabolism / I. A. Orlov, T. P. Sankova, P. S. Babich [et al.] // *International Journal of Nanomedicine*. – 2016. – Vol. 11. – P. 6561-6574.
159. Newly identified disorder of copper metabolism caused by variants in *CTR1*, a high-affinity copper transporter / S. Batzios, G. Tal, A. T. DiStasio [et al.] // *Human Molecular Genetics*. – 2022. – Vol. 31. – № 24. – P. 4121-4130.
160. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein / H. Büeler, M. Fischer, Y. Lang [et al.] // *Nature*. – 1992. – Vol. 356. – № 6370. – P. 577-582.
161. Novel thiosialosides tethered to metal nanoparticles as potent influenza A virus haemagglutinin blockers / F. Feng, Y. Sakoda, T. Ohyanagi [et al.] // *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*. – 2013. – Vol. 23. – № 2. – P. 59-65.
162. NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome / N. C. Robb, M. Smith, F. T. Vreede, E. Fodor // *The Journal of General Virology*. – 2009. – Vol. 90. – № Pt 6. – P. 1398-1407.
163. O'Connor, L. The Role of the Ubiquitously Expressed Transcription Factor Sp1 in Tissue-specific Transcriptional Regulation and in Disease / L. O'Connor, J. Gilmour, C. Bonifer // *The Yale Journal of Biology and Medicine*. – 2016. – Vol. 89. – № 4. – P. 513-525.
164. Oxidation state-specific fluorescent copper sensors reveal oncogene-driven redox changes that regulate labile copper(II) pools / A. T. Pezacki, C. D. Matier, X. Gu [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2022. – Vol. 119. – № 43. – P. e2202736119.
165. Patel, B. N. A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes / B. N. Patel, S. David // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – Vol. 272. – № 32. – P. 20185-20190.
166. Pathogenesis of pandemic influenza A (H1N1) and triple-reassortant swine influenza A (H1) viruses in mice / J. A. Belser, D. A. Wadford, C. Pappas [et al.] // *Journal of Virology*. – 2010. – Vol. 84. – № 9. – P. 4194-4203.
167. Pauly, P. C. Copper stimulates endocytosis of the prion protein / P. C. Pauly, D. A. Harris // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – Vol. 273. – № 50. – P. 33107-33110.
168. Piasecka, J. Organization of the Influenza A Virus Genomic RNA in the Viral Replication Cycle-Structure, Interactions, and Implications for the Emergence of New Strains / J. Piasecka, A. Jarmolowicz, E. Kierzek // *Pathogens (Basel, Switzerland)*. – 2020. – Vol. 9. – № 11. – P. 951.

169. Polishchuk, R. S. From and to the Golgi - defining the Wilson disease protein road map / R. S. Polishchuk, E. V. Polishchuk // FEBS letters. – 2019. – Vol. 593. – № 17. – P. 2341-2350.
170. Preparation, Characterization, and Antimicrobial and Antiviral Properties of Silver-Containing Nanocomposites Based on Polylactic Acid-Chitosan / V. Demchenko, N. Rybalchenko, S. Zahorodnia [et al.] // ACS applied bio materials. – 2022. – Vol. 5. – № 6. – P. 2576-2585.
171. Prion protein binds copper within the physiological concentration range / M. L. Kramer, H. D. Kratzin, B. Schmidt [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2001. – Vol. 276. – № 20. – P. 16711-16719.
172. Prion protein promotes copper toxicity in Wilson disease / R. Petruzzelli, F. Catalano, R. Crispino [et al.] // Nature Communications. – 2025. – Vol. 16. – № 1. – P. 1468.
173. Prion protein protects mice from lethal infection with influenza A viruses / J. Chida, H. Hara, M. Yano [et al.] // PLoS pathogens. – 2018. – Vol. 14. – № 5. – P. e1007049.
174. Prion protein signaling induces M2 macrophage polarization and protects from lethal influenza infection in mice / J. Chida, H. Hara, K. Uchiyama [et al.] // PLoS pathogens. – 2020. – Vol. 16. – № 8. – P. e1008823.
175. PROPAGATION OF THE VIRUS OF HUMAN INFLUENZA IN THE GUINEA PIG FETUS / O. C. Woolpert, F. W. Gallagher, L. Rubinstein, N. P. Hudson // The Journal of Experimental Medicine. – 1938. – Vol. 68. – № 3. – P. 313-324.
176. Properties of recombinant extracellular N-terminal domain of human high-affinity copper transporter 1 (hNdCTR1) and its interactions with Cu(II) and Ag(I) ions / I. A. Orlov, T. P. Sankova, A. N. Skvortsov [et al.] // Dalton Transactions (Cambridge, England: 2003). – 2023. – Vol. 52. – № 11. – P. 3403-3419.
177. Proteomic and Bioinformatic Characterization of Extracellular Vesicles Released from Human Macrophages upon Influenza A Virus Infection / W. Cypryk, M. Lorey, A. Puustinen [et al.] // Journal of Proteome Research. – 2017. – Vol. 16. – № 1. – P. 217-227.
178. Pulmonary delivery of silver nanoparticles prevents influenza infection by recruiting and activating lymphoid cells / L. Martín-Faivre, L. Prince, C. Cornu [et al.] // Biomaterials. – 2025. – Vol. 312. – P. 122721.
179. Reduction in the COVID-19 pneumonia case fatality rate by silver nanoparticles: A randomized case study / L. Wieler, O. Vittos, N. Mukherjee, S. Sarkar // Heliyon. – 2023. – Vol. 9. – Reduction in the COVID-19 pneumonia case fatality rate by silver nanoparticles. – № 3. – P. e14419.

180. Regulation of RIG-I Activation by K63-Linked Polyubiquitination / M. Okamoto, T. Kouwaki, Y. Fukushima, H. Oshiumi // *Frontiers in Immunology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1942.
181. Robb, N. C. Virus morphology: Insights from super-resolution fluorescence microscopy / N. C. Robb // *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*. – 2022. – Vol. 1868. – Virus morphology. – № 4. – P. 166347.
182. Rydén, L. Model of the active site in the blue oxidases based on the ceruloplasmin-plastocyanin homology / L. Rydén // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1982. – Vol. 79. – № 22. – P. 6767-6771.
183. Sarnataro, D. Cell Biology of Prion Protein / D. Sarnataro, A. Pepe, C. Zurzolo // *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. – 2017. – Vol. 150. – P. 57-82.
184. Schreiber, V. Modulation oestradiol effects by silver nitrate: inhibition of the adenohipophyseal reaction, block of the ceruloplasmin increase and block of hypothalamic ascorbic acid depletion / V. Schreiber, T. Pribyl, J. Jahodová // *Endokrinologie*. – 1980. – Vol. 76. – Modulation oestradiol effects by silver nitrate. – № 2. – P. 129-136.
185. Secretion and uptake of copper via a small copper carrier in blood fluid / B. D. Gioilli, T. Z. Kidane, H. Fieten [et al.] // *Metallomics: Integrated Biometal Science*. – 2022. – Vol. 14. – № 3. – P. mfac006.
186. Secretion without Golgi / I. Prudovsky, F. Tarantini, M. Landriscina [et al.] // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2008. – Vol. 103. – № 5. – P. 1327-1343.
187. Secretory autophagy / M. Ponpuak, M. A. Mandell, T. Kimura [et al.] // *Current Opinion in Cell Biology*. – 2015. – Vol. 35. – P. 106-116.
188. Selenium-binding protein 1 (SELENBP1) is a copper-dependent thiol oxidase / T. M. Philipp, L. Gernoth, A. Will [et al.] // *Redox Biology*. – 2023. – Vol. 65. – P. 102807.
189. Serum depletion of holo-ceruloplasmin induced by silver ions in vivo reduces uptake of cisplatin / E. A. Zatulovskiy, A. N. Skvortsov, P. Rusconi [et al.] // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 2012. – Vol. 116. – P. 88-96.
190. Sex affects the response of Wistar rats to polyvinyl pyrrolidone (PVP)-coated silver nanoparticles in an oral 28 days repeated dose toxicity study / M. Ćurlin, R. Barbir, S. Dabelić [et al.] // *Particle and Fibre Toxicology*. – 2021. – Vol. 18. – № 1. – P. 38.
191. Shpakov, A. O. Allosteric Regulation of G-Protein-Coupled Receptors: From Diversity of Molecular Mechanisms to Multiple Allosteric Sites and Their Ligands / A. O. Shpakov // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – Allosteric Regulation of G-Protein-Coupled Receptors. – № 7. – P. 6187.

192. Sies, H. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents / H. Sies, D. P. Jones // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. – 2020. – Vol. 21. – № 7. – P. 363-383.
193. Signaling from the secretory granule to the nucleus: Uhmkl and PAM / V. P. Francone, M. F. Ifrim, C. Rajagopal [et al.] // *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*. – 2010. – Vol. 24. – Signaling from the secretory granule to the nucleus. – № 8. – P. 1543-1558.
194. Silver Ions as a Tool for Understanding Different Aspects of Copper Metabolism / L. V. Puchkova, M. Brogini, E. V. Polishchuk [et al.] // *Nutrients*. – 2019. – Vol. 11. – № 6. – P. 1364.
195. Silver Nanoparticles Impair Retinoic Acid-Inducible Gene I-Mediated Mitochondrial Antiviral Immunity by Blocking the Autophagic Flux in Lung Epithelial Cells / B. Villeret, A. Dieu, M. Straube [et al.] // *ACS nano*. – 2018. – Vol. 12. – № 2. – P. 1188-1202.
196. Silver Nanoparticles: Review of Antiviral Properties, Mechanism of Action and Applications / A. Luceri, R. Francese, D. Lembo [et al.] // *Microorganisms*. – 2023. – Vol. 11. – Silver Nanoparticles. – № 3. – P. 629.
197. Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety / L. Xu, Y.-Y. Wang, J. Huang [et al.] // *Theranostics*. – 2020. – Vol. 10. – Silver nanoparticles. – № 20. – P. 8996-9031.
198. Size-Dependent Bioactivity of Silver Nanoparticles: Antibacterial Properties, Influence on Copper Status in Mice, and Whole-Body Turnover / E. A. Skomorokhova, T. P. Sankova, I. A. Orlov [et al.] // *Nanotechnology, Science and Applications*. – 2020. – Vol. 13. – Size-Dependent Bioactivity of Silver Nanoparticles. – P. 137-157.
199. Smith-Mungo, L. I. Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology / L. I. Smith-Mungo, H. M. Kagan // *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*. – 1998. – Vol. 16. – Lysyl oxidase. – № 7. – P. 387-398.
200. Solution structure and interaction with copper in vitro and in living cells of the first BIR domain of XIAP / M.-M. Hou, P. Polykretis, E. Luchinat [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 16630.
201. Specificity protein 1 (sp1) oscillation is involved in copper homeostasis maintenance by regulating human high-affinity copper transporter 1 expression / Z. D. Liang, W.-B. Tsai, M.-Y. Lee [et al.] // *Molecular Pharmacology*. – 2012. – Vol. 81. – № 3. – P. 455-464.
202. Steiner, D. F. The proprotein convertases / D. F. Steiner // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 1998. – Vol. 2. – № 1. – P. 31-39.

203. Structural and Functional Diversity Among the Members of CTR, the Membrane Copper Transporter Family / T. Mandal, S. Kar, S. Maji [et al.] // *The Journal of Membrane Biology*. – 2020. – Vol. 253. – № 5. – P. 459-468.
204. Structural insight into the essential PB1-PB2 subunit contact of the influenza virus RNA polymerase / K. Sugiyama, E. Obayashi, A. Kawaguchi [et al.] // *The EMBO journal*. – 2009. – Vol. 28. – № 12. – P. 1803-1811.
205. Structural Investigations of Interactions between the Influenza A Virus NS1 and Host Cellular Proteins / M. E. Blake, A. B. Kleinpeter, A. S. Jureka, C. M. Petit // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15. – № 10. – P. 2063.
206. Structure and Function of Human Tyrosinase and Tyrosinase-Related Proteins / X. Lai, H. J. Wichers, M. Soler-Lopez, B. W. Dijkstra // *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*. – 2018. – Vol. 24. – № 1. – P. 47-55.
207. Structures of Silver Fingers and a Pathway to Their Genotoxicity / K. Kluska, G. Veronesi, A. Deniaud [et al.] // *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*. – 2022. – Vol. 61. – № 12. – P. e202116621.
208. Subacute oral toxicity investigation of nanoparticulate and ionic silver in rats / N. Hadrup, K. Loeschner, A. Bergström [et al.] // *Archives of Toxicology*. – 2012. – Vol. 86. – № 4. – P. 543-551.
209. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles / Y. S. Kim, M. Y. Song, J. D. Park [et al.] // *Particle and Fibre Toxicology*. – 2010. – Vol. 7. – P. 20.
210. Systemic and immunotoxicity of silver nanoparticles in an intravenous 28 days repeated dose toxicity study in rats / W. H. De Jong, L. T. M. Van Der Ven, A. Sleijffers [et al.] // *Biomaterials*. – 2013. – Vol. 34. – № 33. – P. 8333-8343.
211. Tang, S. Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects / S. Tang, J. Zheng // *Advanced Healthcare Materials*. – 2018. – Vol. 7. – Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. – № 13. – P. e1701503.
212. Taylor, R. M. EXPERIMENTAL INFECTION WITH INFLUENZA A VIRUS IN MICE : THE INCREASE IN INTRAPULMONARY VIRUS AFTER INOCULATION AND THE INFLUENCE OF VARIOUS FACTORS THEREON / R. M. Taylor // *The Journal of Experimental Medicine*. – 1941. – Vol. 73. – EXPERIMENTAL INFECTION WITH INFLUENZA A VIRUS IN MICE. – № 1. – P. 43-55.
213. The biology of mammalian multi-copper ferroxidases / S. L. Helman, J. Zhou, B. K. Fuqua [et al.] // *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*. – 2023. – Vol. 36. – № 2. – P. 263-281.

214. The Crossroads between Host Copper Metabolism and Influenza Infection / L. V. Puchkova, I. V. Kiseleva, E. V. Polishchuk [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22. – № 11. – P. 5498.
215. The crystal structure of human dopamine β -hydroxylase at 2.9 Å resolution / T. V. Vendelboe, P. Harris, Y. Zhao [et al.] // Science Advances. – 2016. – Vol. 2. – № 4. – P. e1500980.
216. The effect of silver ions on copper metabolism and expression of genes encoding copper transport proteins in rat liver / S. A. Klotchenko, N. V. Tsymbalenko, K. V. Solov'ev [et al.] // Doklady. Biochemistry and Biophysics. – 2008. – Vol. 418. – P. 24-27.
217. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth / O. Choi, K. K. Deng, N.-J. Kim [et al.] // Water Research. – 2008. – Vol. 42. – № 12. – P. 3066-3074.
218. The Inorganic Perspective of VEGF: Interactions of Cu(2+) with Peptides Encompassing a Recognition Domain of the VEGF Receptor / G. Grasso, A. M. Santoro, A. Magri [et al.] // Journal of Inorganic Biochemistry. – 2016. – Vol. 159. – The Inorganic Perspective of VEGF. – P. 149-158.
219. The mammalian copper transporters CTR1 and CTR2 and their roles in development and disease / N. K. Y. Wee, D. C. Weinstein, S. T. Fraser, S. J. Assinder // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. – 2013. – Vol. 45. – № 5. – P. 960-963.
220. The potential renal toxicity of silver nanoparticles after repeated oral exposure and its underlying mechanisms / H. Nosrati, M. Hamzepoor, M. Sohrabi [et al.] // BMC nephrology. – 2021. – Vol. 22. – № 1. – P. 228.
221. Three-dimensional structure of the human copper transporter hCTR1 / C. J. De Feo, S. G. Aller, G. S. Siluvai [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2009. – Vol. 106. – № 11. – P. 4237-4242.
222. Tomas, E. A probable model of the inhibitory action of ceruloplasmin on the multiplication of some myxo- and paramyxoviruses / E. Tomas, I. Samuel // Virologie. – 1980. – Vol. 31. – № 2. – P. 131-134.
223. Tomas, E. The effect of some drugs and of ceruloplasmin on experimental influenza APR 8/34 (H0N1) infection in the mouse / E. Tomas, I. Samuel, F. Bârnaure // Virologie. – 1979. – Vol. 30. – № 3. – P. 233-234.
224. Tomas, E. Considerations about the possible function of ceruloplasmin in influenza and parainfluenza virus infections / E. Tomas, F. Topârceanu // Virologie. – 1986. – Vol. 37. – № 4. – P. 279-287.

225. Torres, J. The reactions of copper proteins with nitric oxide / J. Torres, M. T. Wilson // *Biochimica Et Biophysica Acta*. – 1999. – Vol. 1411. – № 2-3. – P. 310-322.
226. Toxicological evaluation of silver nanoparticles and silver nitrate in rats following 28 days of repeated oral exposure / G. Qin, S. Tang, S. Li [et al.] // *Environmental Toxicology*. – 2017. – Vol. 32. – № 2. – P. 609-618.
227. Trammell, R. A. Host genetic background and the innate inflammatory response of lung to influenza virus / R. A. Trammell, T. A. Liberati, L. A. Toth // *Microbes and Infection*. – 2012. – Vol. 14. – № 1. – P. 50-58.
228. Transcuprein is a macroglobulin regulated by copper and iron availability / N. Liu, L. S. Lo, S. H. Askary [et al.] // *The Journal of Nutritional Biochemistry*. – 2007. – Vol. 18. – № 9. – P. 597-608.
229. Vallet, S. D. Lysyl oxidases: from enzyme activity to extracellular matrix cross-links / S. D. Vallet, S. Ricard-Blum // *Essays in Biochemistry*. – 2019. – Vol. 63. – Lysyl oxidases. – № 3. – P. 349-364.
230. Vashchenko, G. Functional role of the putative iron ligands in the ferroxidase activity of recombinant human hephaestin / G. Vashchenko, R. T. A. Macgillivray // *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*. – 2012. – Vol. 17. – № 8. – P. 1187-1195.
231. Vertebrate *Ctr1* coordinates morphogenesis and progenitor cell fate and regulates embryonic stem cell differentiation / T. Haremak, S. T. Fraser, Y.-M. Kuo [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2007. – Vol. 104. – № 29. – P. 12029-12034.
232. Wapnir, R. A. Copper absorption and bioavailability / R. A. Wapnir // *The American Journal of Clinical Nutrition*. – 1998. – Vol. 67. – № 5 Suppl. – P. 1054S-1060S.
233. Weiskirchen, R. COMMD1, a multi-potent intracellular protein involved in copper homeostasis, protein trafficking, inflammation, and cancer / R. Weiskirchen, L. C. Penning // *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*. – 2021. – Vol. 65. – P. 126712.
234. Wiley, B. Synthesis of silver nanostructures with controlled shapes and properties / B. Wiley, Y. Sun, Y. Xia // *Accounts of Chemical Research*. – 2007. – Vol. 40. – № 10. – P. 1067-1076.
235. Wirth, P. L. Distribution of copper among components of human serum / P. L. Wirth, M. C. Linder // *Journal of the National Cancer Institute*. – 1985. – Vol. 75. – № 2. – P. 277-284.

236. Yamauchi, Y. Influenza A virus uncoating / Y. Yamauchi // *Advances in Virus Research*. – 2020. – Vol. 106. – P. 1-38.
237. Zaffryar-Eilot, S. Lysyl Oxidases: Orchestrators of Cellular Behavior and ECM Remodeling and Homeostasis / S. Zaffryar-Eilot, P. Hasson // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – Lysyl Oxidases. – № 19. – P. 11378.
238. Zhu, Z. A structural understanding of influenza virus genome replication / Z. Zhu, E. Fodor, J. R. Keown // *Trends in Microbiology*. – 2023. – Vol. 31. – № 3. – P. 308-319.
239. Development of a murine nose-only inhalation model of influenza: comparison of disease caused by instilled and inhaled A/PR/8/34 / L. E. Bowen, K. Rivers, J. E. Trombley [et al.]. – Text : electronic // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2012. – Vol. 2. – Development of a murine nose-only inhalation model of influenza. – URL: <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2012.00074/full> (date accessed: 14.05.2025).
240. Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement / D. Dou, R. Revol, H. Östbye [et al.]. – Text : electronic // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Vol. 9. – URL: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2018.01581/full> (date accessed: 13.02.2025).
241. Prism - GraphPad. – URL: <https://www.graphpad.com/features> (date accessed: 10.06.2025). – Text : electronic.
242. Protective role of silver nanoparticles in influenza infection / M. A. Farroukh, A. Ф. Мохаммад, E. A. Skomorokhova [et al.] // *Medical academic journal*. – 2021. – Vol. 21. – № 3. – P. 81-84.
243. [In vivo expression of copper transporting proteins in rat brain sections] / N. A. Platonova, S. V. Barabanova, R. G. Povalikhin [et al.] // *Izvestiia Akademii Nauk. Seriya Biologicheskaya*. – 2005. – № 2. – P. 141-154.
244. [Leading role of genes coding polymerase complex in attenuation of domestic donor viruses for A and B live influenza vaccine] / I. V. Kiseleva, N. V. Larionova, J. T. M. Voeten [et al.] // *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii*. – 2010. – № 6. – P. 41-47.
245. [Properties of silver-containing rat ceruloplasmin] / T. Pribyl, T. D. Aleinikova, V. B. Vasil'ev [et al.] // *Biokhimiia (Moscow, Russia)*. – 1989. – Vol. 54. – № 4. – P. 601-609.
246. Skvortsov, A. N. [Structure-functional organization of eukaryotic high-affinity copper importer CTR1 determines its ability to transport copper, silver and cisplatin] / A. N. Skvortsov, E. A. Zatulovskii, L. V. Puchkova // *Molekuliarnaya Biologiya*. – 2012. – Vol. 46. – № 2. – P. 335-347.

247. Tsymbal, S. A. [The p53 Tumor Suppressor and Copper Metabolism: An Unrevealed but Important Link] / S. A. Tsymbal, A. G. Refeld, O. A. Kuchur // *Molekuliarnaia Biologiya*. – 2022. – Vol. 56. – [The p53 Tumor Suppressor and Copper Metabolism. – № 6. – P. 1057-1071.
248. Vasil'ev, V. B. [Dismutation of superoxide radicals by ceruloplasmin--details of the mechanism] / V. B. Vasil'ev, A. M. Kachurin, N. V. Soroka // *Biokhimiia* (Moscow, Russia). – 1988. – Vol. 53. – № 12. – P. 2051-2058.
249. Коттон Ф. Современная неорганическая химия / Ф. Коттон, Дж. Уилкинсон М.: Мир. – 1969. – т. 3. 592 с.
250. Закстельская Л.Я. Токсичность вируса гриппа / Л.Я. Закстельская М.:изд-во АМН СССР. – 1953. – 84с.

9. Приложение

Таблица 1: Список дополнительных вирусов ВГА (H1N1)pdm09, выделенных в период с 2009 по 2021 год и доступных на платформе GISAID, использованных для проверки уникальности мутаций, обнаруженных в SA штамме

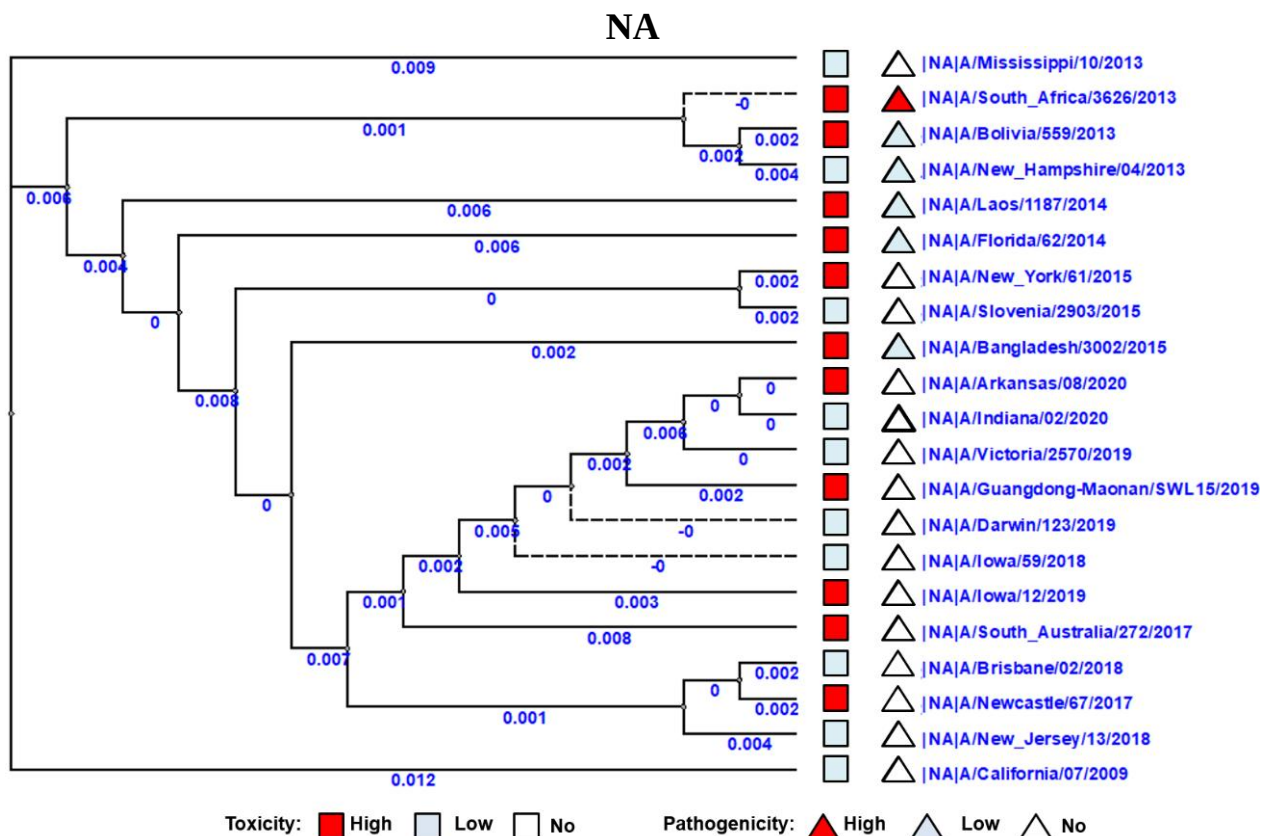
N	(H1N1)pdm virus	GISAID isolate ID
1	A/Argentina/HNRG13/2009	ID EPI_ISL_66020
2	A/Bangladesh/2021/2012	ID EPI_ISL_131353
3	A/Beijing-Dongcheng/SWL51/2011	ID EPI_ISL_94552
4	A/California/02/2010	ID EPI_ISL_71356
5	A/Chongqing-Wanzhou/SWL53/2011	ID EPI_ISL_94563
6	A/DARWIN/56/2013	ID EPI_ISL_148746
7	A/Delaware/06/2011	ID EPI_ISL_88073
8	A/El_Salvador/211/2009	ID EPI_ISL_30137
9	A/England/200/2009	ID EPI_ISL_30626
10	A/Ethiopia/45/2010	ID EPI_ISL_71367
11	A/FIJI/4/2012	ID EPI_ISL_128688
12	A/Fujian-Yanping/SWL1115/2010	ID EPI_ISL_75084
13	A/Georgia/01/2010	ID EPI_ISL_71371
14	A/Guangdong-Xinxing/SWL198/2011	ID EPI_ISL_94583
15	A/Guangdong/2/2009	ID EPI_ISL_30734
16	A/Hong_Kong/01/2009	ID EPI_ISL_30627
17	A/Hunan-Furong/SWL410/2011	ID EPI_ISL_94551
18	A/Iowa/01/2010	ID EPI_ISL_70323
19	A/Jilin-Nanguan/SWL181/2010	ID EPI_ISL_75089
20	A/Kenya/196/2011	ID EPI_ISL_106806
21	A/Louisiana/07/2013	ID EPI_ISL_150042

22	A/Maine/04/2011	ID EPI_ISL_88099
23	A/Maryland/04/2011	ID EPI_ISL_88101
24	A/Maryland/13/2012	ID EPI_ISL_128402
25	A/Mexico/254/2012	ID EPI_ISL_103741
26	A/Michigan/03/2011	ID EPI_ISL_94671
27	A/Moscow/IIV-45/2012	ID EPI_ISL_127690
28	A/Nairobi/3/2009	ID EPI_ISL_140403
29	A/New_Mexico/04/2011	ID EPI_ISL_90942
30	A/New_Zealand/871/2009	ID EPI_ISL_73420
31	A/Qingdao/1364/2009	ID EPI_ISL_77405
32	A/Russia/14/2009	ID EPI_ISL_66074
33	A/SHIGA/44/2009	ID EPI_ISL_65882
34	A/SINGAPORE/12/2012	ID EPI_ISL_128691
35	A/SRI_LANKA/22/2012	ID EPI_ISL_128694
36	A/SRI_LANKA/30/2013	ID EPI_ISL_148748
37	A/Shaanxi-Beilin/SWL134/2010	ID EPI_ISL_75086
38	A/Singapore/GN285/2009	ID EPI_ISL_70517
39	A/Singapore/GP999/2010	ID EPI_ISL_75739
40	A/Texas/23/2012	ID EPI_ISL_115085
41	A/Utah/05/2009	ID EPI_ISL_33589
42	A/Vladivostok/28/2012	ID EPI_ISL_128296
43	A/Washington/24/2012	ID EPI_ISL_128403
44	A/Wisconsin/16/2011	ID EPI_ISL_89931
45	A/TASMANIA/24/2014	ID EPI_ISL_166026
46	A/Lebanon/14L61/2014	ID EPI_ISL_176844
47	A/Myanmar/14M272/2014	ID EPI_ISL_173349
48	A/SRI_LANKA/31/2014	ID EPI_ISL_166024
49	A/NONTHABURI/248/2014	ID EPI_ISL_166017
50	A/NEW_CALEDONIA/72/2014	ID EPI_ISL_168854
51	A/Malaysia/11/2014	ID EPI_ISL_171806
52	A/CHRISTCHURCH/538/2014	ID EPI_ISL_168850
53	A/Bulgan/1852/2014	ID EPI_ISL_166015
54	A/AUCKLAND/8/2014	ID EPI_ISL_168841
55	A/South_Australia/22/2015	ID EPI_ISL_192758
56	A/Cambodia/FSS39385/2015	ID EPI_ISL_194497
57	A/India/Pun151268/2015	ID EPI_ISL_218434
58	A/India/Pun151192/2015	ID EPI_ISL_218432
59	A/Peru/51/2015	ID EPI_ISL_203613
60	A/Pakistan/336/2015	ID EPI_ISL_203612
61	A/Massachusetts/30/2015	ID EPI_ISL_203611
62	A/Maryland/16/2015	ID EPI_ISL_203609
63	A/Kentucky/14/2015	ID EPI_ISL_203608
64	A/Illinois/20/2015	ID EPI_ISL_203607
65	A/Florida/88/2015	ID EPI_ISL_203601
66	A/Colorado/14/2015	ID EPI_ISL_203597
67	A/Arkansas/10/2015	ID EPI_ISL_203592
68	A/Sri_Lanka/47/2016	ID EPI_ISL_246666
69	A/Saint-Petersburg/R1150/2016	ID EPI_ISL_234028

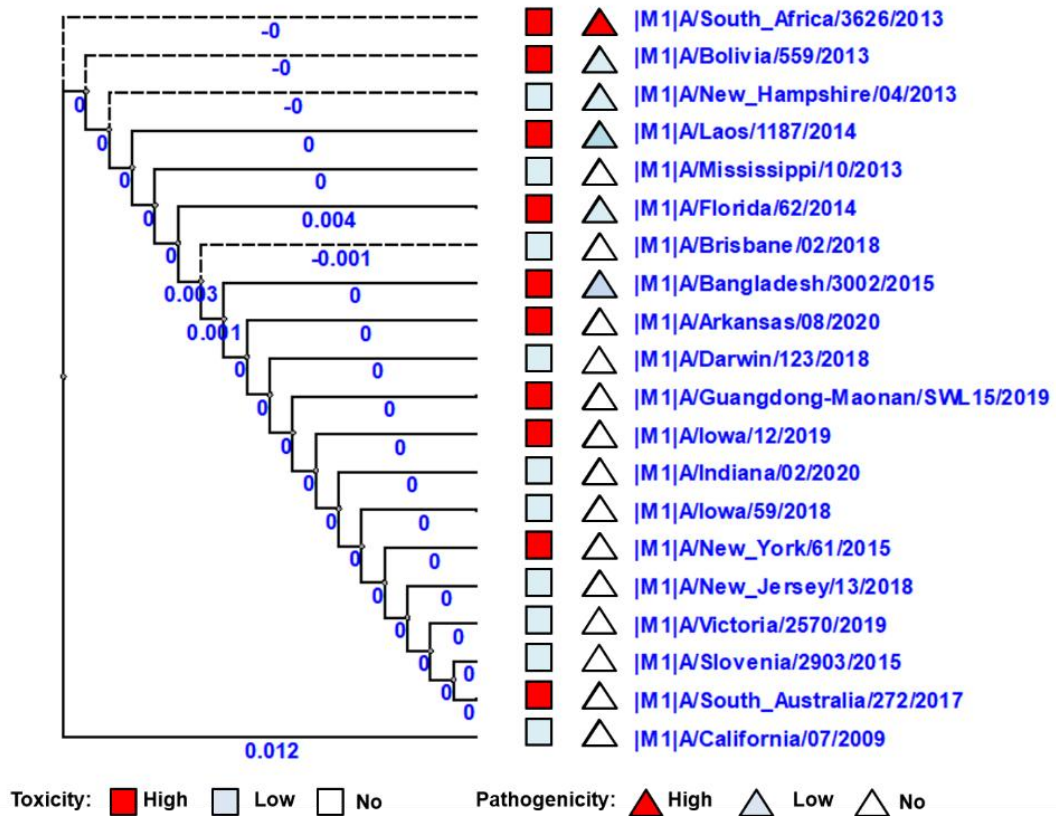
70	A/Stavropol/RII05/2016	ID EPI_ISL_234027
71	A/Krasnodar/RII40/2016	ID EPI_ISL_234026
72	A/Ulan-Ude/RII02/2016	ID EPI_ISL_234019
73	A/Simferopol/RII4208S/2016	ID EPI_ISL_234009
74	A/Vladivostok/RII833/2016	ID EPI_ISL_233997
75	A/Moscow/SEC-03/2016	ID EPI_ISL_233994
76	A/Kaliningrad/RII53/2016	ID EPI_ISL_233990
77	A/Astrakhan/RII03/2016	ID EPI_ISL_233984
78	A/Novosibirsk/RII70/2016	ID EPI_ISL_233983
79	A/Stavropol/RII04/2016	ID EPI_ISL_233978
80	A/Tula/RII01/2016	ID EPI_ISL_233972
81	A/Wyoming/30/2017	ID EPI_ISL_289585
82	A/Wisconsin/338/2017	ID EPI_ISL_289583
83	A/West_Virginia/28/2017	ID EPI_ISL_289582
84	A/Utah/40/2017	ID EPI_ISL_289579
85	A/Texas/310/2017	ID EPI_ISL_289577
86	A/New_York/46/2017	ID EPI_ISL_289575
87	A/Iowa/43/2017	ID EPI_ISL_289571
88	A/Hawaii/59/2017	ID EPI_ISL_289565
89	A/Alaska/67/2017	ID EPI_ISL_287699
90	A/Kenya/101/2017	ID EPI_ISL_287686
91	A/Bangladesh/2004/2017	ID EPI_ISL_287685
92	A/Hong_Kong/4821/2017	ID EPI_ISL_286081
93	A/New_Zealand/2333/2017	ID EPI_ISL_286071
94	A/Mali/086/2017	ID EPI_ISL_285866
95	A/Wrexham/0828/2018	ID EPI_ISL_332694
96	A/Wrexham/9249/2018	ID EPI_ISL_332693
97	A/Cardiff/5013/2018	ID EPI_ISL_332691
98	A/Port_Talbot/1276/2018	ID EPI_ISL_332688
99	A/Bridgend/1275/2018	ID EPI_ISL_332686
100	A/Swansea/0201/2018	ID EPI_ISL_332404
101	A/Neath/0114/2018	ID EPI_ISL_332355
102	A/Penarth/6242/2018	ID EPI_ISL_331351
103	A/Swansea/7064/2018	ID EPI_ISL_309446
104	A/Rhyl/5712/2018	ID EPI_ISL_307610
105	A/Cardiff/9630/2019	ID EPI_ISL_400521
106	A/Wrexham/1126/2019	ID EPI_ISL_350699
107	A/Barry/9660/2019	ID EPI_ISL_350696
108	A/Pontypridd/6749/2019	ID EPI_ISL_340372
109	A/Monmouth/6723/2019	ID EPI_ISL_340368
110	A/Usk/5355/2019	ID EPI_ISL_339313
111	A/Tredeggar/5240/2019	ID EPI_ISL_336025
112	A/Newport/5104/2019	ID EPI_ISL_335731
113	A/Abergavenny/5099/2019	ID EPI_ISL_335730
114	A/Caldicot/5096/2019	ID EPI_ISL_335728
115	A/Holywell/0308/2019	ID EPI_ISL_335600
116	A/Denbigh/6913/2019	ID EPI_ISL_334414
117	A/Jilin-Chuanying/SWL14/2020	ID EPI_ISL_485571

118	A/Beijing-Huairou/SWL123/2020	ID EPI_ISL_485570
119	A/Shanghai-Chongming/SWL134/2020	ID EPI_ISL_485566
120	A/Fujian-Cangshan/SWL185/2020	ID EPI_ISL_522422
121	A/Liaoning-Guta/SWL1401/2020	ID EPI_ISL_522421
122	A/Heilongjiang-Gongnong/SWL1208/2020	ID EPI_ISL_522419
123	A/Saint-Petersburg/RII-1143S/2020	ID EPI_ISL_528725
124	A/Novosibirsk/RII-26925S/2020	ID EPI_ISL_497894
125	A/Kurgan/139V/2020	ID EPI_ISL_414666
126	A/Port_Talbot/0479/2020	ID EPI_ISL_413637
127	A/Togo/0291/2021	ID EPI_ISL_2918715
128	A/North_Carolina/01/2021	ID EPI_ISL_2519774
129	A/Dominican_Republic/7293/2013	ID EPI_ISL_145504
130	A/Puerto_Rico/01/2013	ID EPI_ISL_145509
131	A/India/Nag132467/2013	ID EPI_ISL_146123
132	A/Haiti/1790/2013	ID EPI_ISL_145496
133	A/HIROSHIMA/19/2013	ID EPI_ISL_143715
134	A/St._Petersburg/151/2013	ID EPI_ISL_140999

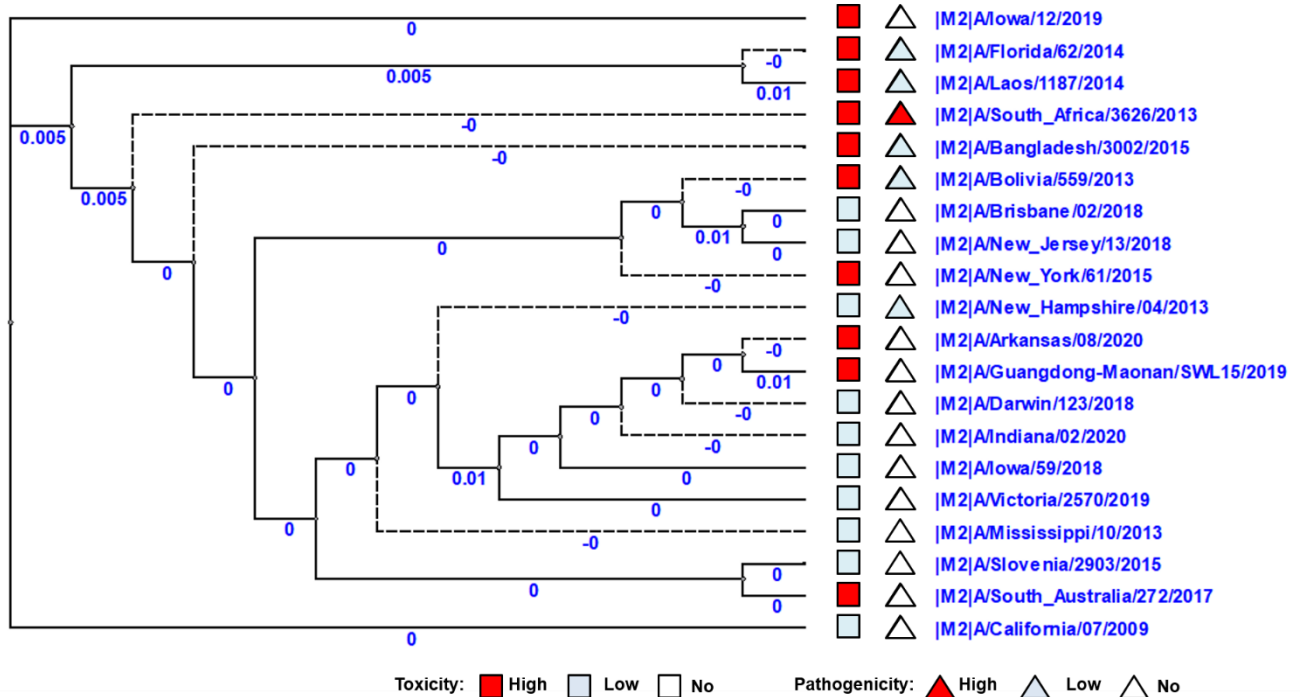
филогенетические древа остальных 9 белков штаммов ВГА H1N1pdm09



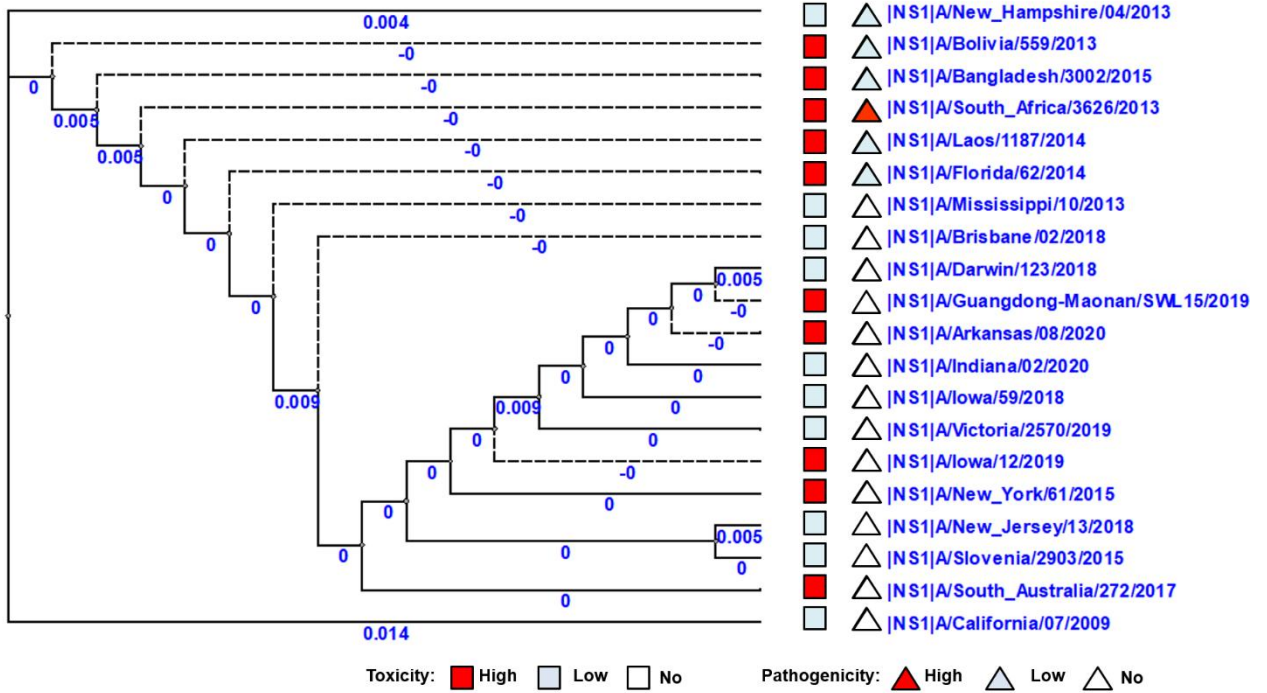
M1



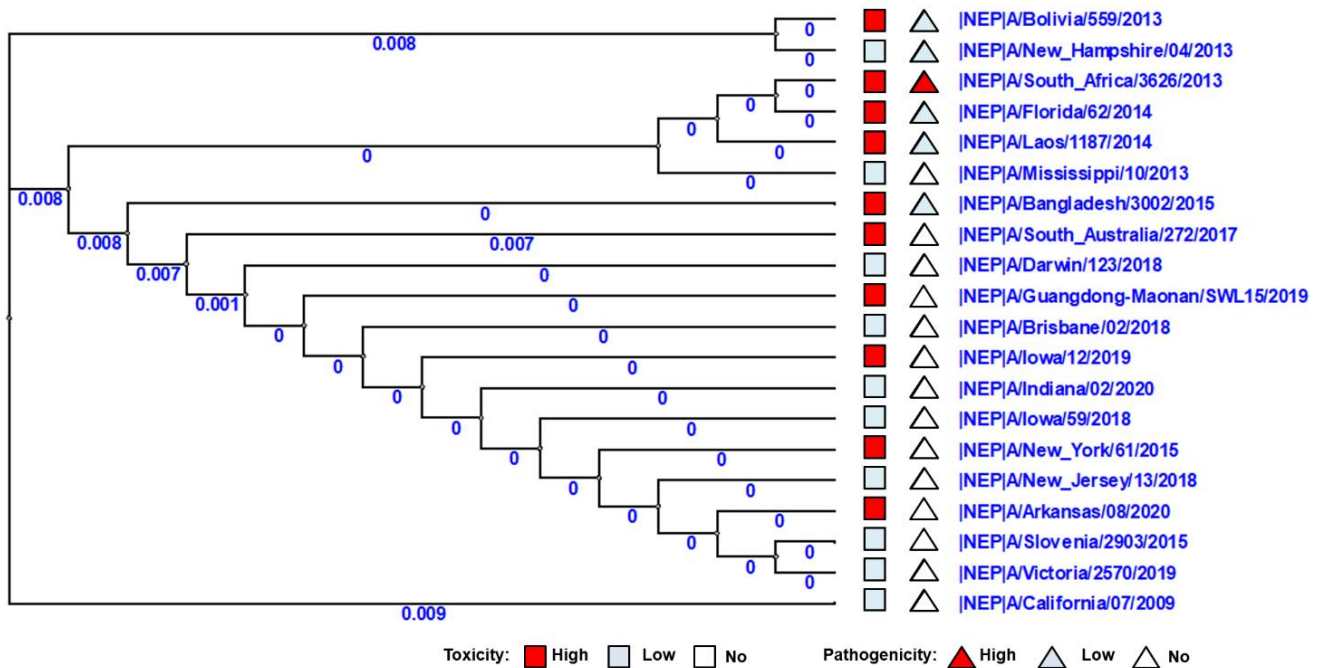
M2



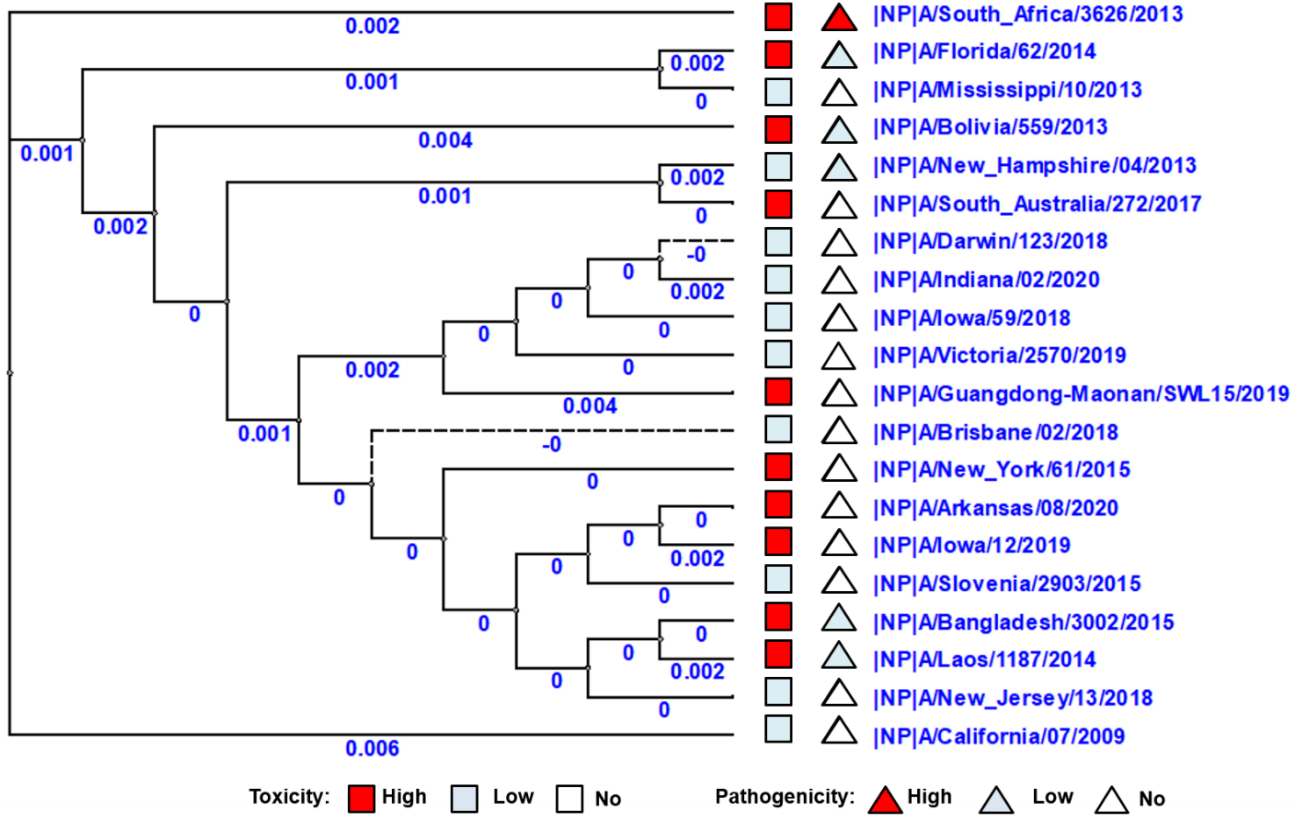
NS1



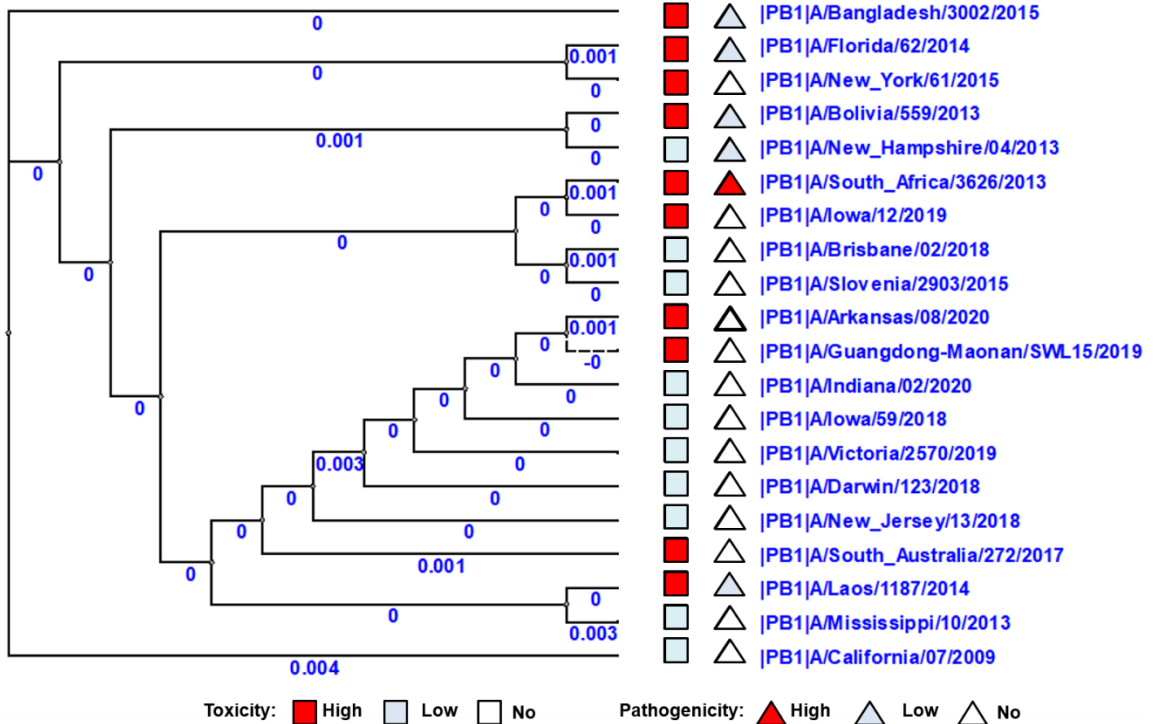
NEP



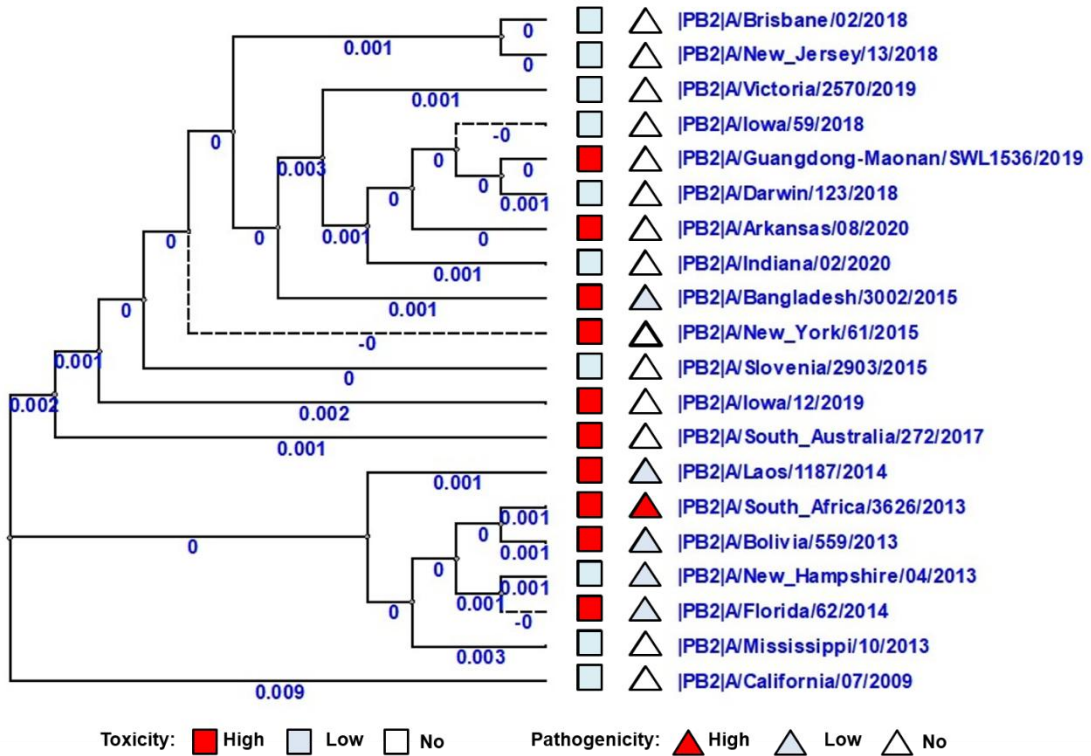
NP



PB1



PB2



PA

