

Исследование воздействия инактивирующих агентов на структуру аденовирусных частиц методами малоуглового рентгеновского рассеяния и просвечивающей электронной микроскопии

© Д.А. Крылов¹, А.Т. Табаров¹, Д.М. Даниленко², В.В. Виткин¹

¹ Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

² Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: danilakrylov0@gmail.com

Поступило в Редакцию 17 марта 2025 г.

В окончательной редакции 3 июля 2025 г.

Принято к публикации 4 июля 2025 г.

С использованием методов малоуглового рентгеновского рассеяния и просвечивающей электронной микроскопии исследовано влияние инактивирующих агентов (формалина и β -пропиолактона) на структуру вирусных частиц. Получены данные, свидетельствующие о разрушении естественной структуры аденовируса вследствие воздействия β -пропиолактона. Результаты исследования могут оказаться полезными при разработке вакцин.

Ключевые слова: вирусы, инаktivация, малоугловое рентгеновское рассеяние, синхротронные исследования.

DOI: 10.61011/PJTF.2025.19.61147.20315

Структура инаktivированных вирусов может быть восстановлена с разрешением до нескольких ангстрем благодаря криоэлектронной микроскопии [1,2]. Однако криоэлектронная микроскопия является дорогим и сложным методом, недоступным широкому кругу исследователей [3].

В настоящее время сравнительно простой и доступный метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) активно используется при изучении сложных биологических молекул и вирусов [4]. В частности, метод МУРР применялся для анализа структуры различных вирусов: вируса гепатита В и SV40 на разных стадиях жизненного цикла [5], X-вируса картофеля и вируса мозаики альтернантеры [6], бактериофага Φ h6, инаktivированного этанолом, который обычно используется в качестве заменителя патогенных вирусов человека [7]. Метод МУРР в сочетании с просвечивающей электронной микроскопией (ПЭМ) использовался для изучения структуры вируса табачной мозаики [8], интактных и частично трипсинизированных образцов вируса картофеля А [9].

Анализ литературных источников не обнаружил работ, посвященных сравнению структурных изменений вируса под действием различных инаktivаторов, проведенного на основе анализа данных МУРР. В связи с гетерогенностью вирусов существует необходимость в привлечении дополнительного метода, позволяющего сравнивать структуру вирионов, которые подверглись воздействию разных химических агентов.

В настоящей работе благодаря комбинированию методов МУРР и ПЭМ было установлено, что β -пропиолактон способен вызвать разрушение частиц аденовируса, тогда как мягкое воздействие формалина

не приводит к изменениям общей структуры вирионов. Обнаружение этого эффекта расширяет наши знания о вирулицидной активности β -пропиолактона и формалина и может быть использовано при разработке вакцин.

В качестве объекта исследования были представлены два штамма аденовирусов: аденовирус 6 типа (штамм Tonsil-99) и аденовирус 26 типа (штамм 415). Было проведено накопление данных аденовирусов в культуре клеток А-549 и получены суспензии вирусов при помощи ультрацентрифугирования. Полученная суспензия каждого штамма была разделена на шесть частей для обработки β -пропиолактоном и обработки формальдегидом. Данные типы инаktivаторов выбраны как самые доступные и часто используемые при изготовлении вакцин. Все полученные суспензии вирусосодержащей жидкости были предварительно подвергнуты осветлению и после процедур инаktivации сконцентрированы в градиенте сахарозы. Концентрированные суспензии аденовирусов были ресуспендированы в буфере STE (Sodium Chloride-Tris-EDTA, 1X Solution, pH = 8.0), и была определена концентрация белка с использованием набора реагентов Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Чтобы обеспечить точность и воспроизводимость данных, содержание белка во всех пробах было установлено на уровне 1 μ g/ml. Проверка инаktivации образцов проводилась в соответствии с МУ 3.5.2431-08 („Изучение и оценка вирулицидной активности дезинфицирующих средств“, п. 3 и 5). Все 12 образцов были протестированы на наличие инфекционной активности на культуре клеток А-549. Инфекционный титр вируса из пробы равен нулю для всех образцов. В концентрированных препаратах очищенных аденовирусов было проведено исследование полученных образцов с помощью просвечивающего электронного

микроскопа JEM 1011 (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 kV в диапазоне инструментальных увеличений 50 000–250 000.

Характеристики образцов аденовируса представлены в таблице.

На электронных микрофотографиях практически не прослеживается изменение структуры вирионов, инактивированных одним типом инактиватора в разных концентрациях. В связи с этим приводятся две электронные микрофотографии: образца, инактивированного формалином, и образца, инактивированного β -пропиолактоном. Как показано далее, данные МУРР от образцов, инактивированных одним типом инактиватора с разной концентрацией соответствующего инактиватора, почти не отличаются друг от друга. Электронная микрофотография образца № 1, инактивированного формалином, приведена на рис. 1.

Электронная микрофотография образца № 11, инактивированного β -пропиолактоном, приведена на рис. 2.

Для проведения измерений кривых малоуглового рентгеновского рассеяния инактивированных вирусных частиц использовались линейный ускоритель, большое накопительное кольцо „Сибирь-2“ и экспериментальная станция „БиоМУР“ большого исследовательского комплекса „КИСИ-Курчатов“ [10]. Образцы вирусосодержащей суспензии были помещены в тонкостенные кварцевые капилляры длиной 80 mm, диаметром 1.5 mm с толщиной стенок 0.01 mm (Quarzkapillaren, Германия). Для регистрации рентгенограмм использовался двухкоординатный детектор DECTRIS Pilatus3 1M с разрешением 981×1043 точек, размером пикселя $172 \mu\text{m}$, установленный на расстоянии 2500 mm от образца. Для каждого из 12 образцов проводилось по три измерения

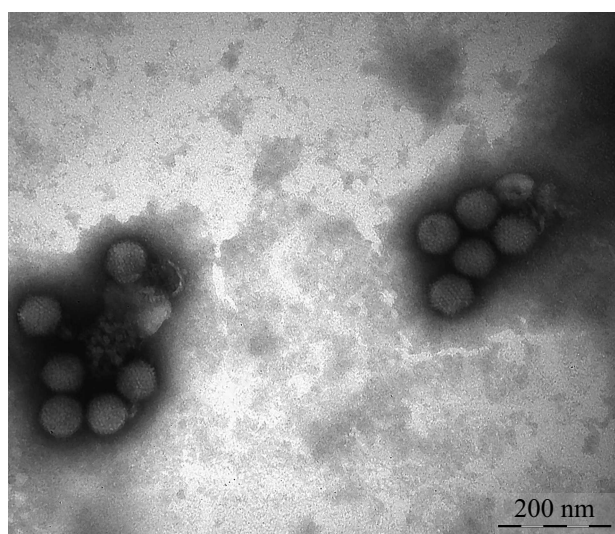


Рис. 1. Электронная микрофотография аденовирусов из образца № 1, инактивированных формалином. В суспензии присутствуют как сами аденовирусы, так и остатки клеток А-549, в которых аденовирусы выращивались. Видно, что цельность капсидов не нарушена.

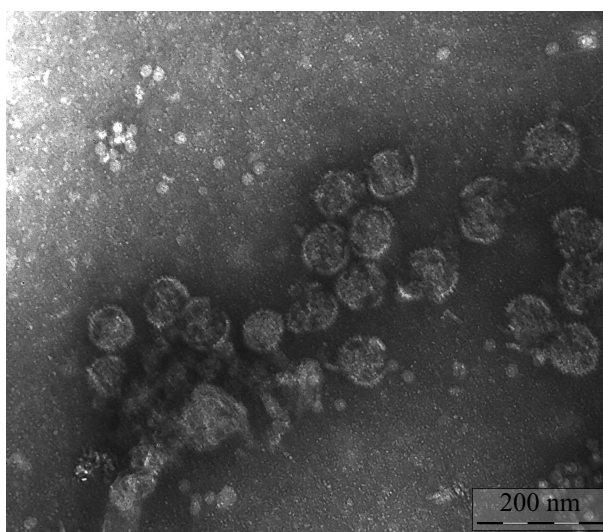


Рис. 2. Электронная микрофотография аденовирусов из образца № 11, инактивированных β -пропиолактоном. Хорошо видна фрагментация капсидов.

кривых интенсивности с экспозицией 300 с каждое. Эксперимент проводился при температуре 27°C .

В результате интегрирования экспериментальных двумерных картин рассеяния получены кривые рассеяния (рис. 3), которые представляют собой зависимость интенсивности рассеянного излучения $I(s)$ от квадрата модуля вектора рассеяния $s = 4\pi \sin \theta / \lambda$, где θ — угол рассеяния, λ — длина волны излучения. Рассеяние на большие углы несет информацию о мелкомасштабных рассеивающих объектах (номинальное разрешение d метода МУРР определяется соотношением $d = 2\pi/s$) [4]. Соответственно большее значение модуля вектора рассеяния s ассоциируется с более мелкими объектами.

Был проведен сравнительный анализ кривых $I(s)$ от образцов аденовирусов 6 типа (Ad6) и 26 типа (Ad26), инактивированных формалином и β -пропиолактоном.

На рис. 3 приведены кривые рассеяния от всех 12 образцов, так как кривые рассеяния от образцов, инактивированных одним типом инактиватора, мало отличаются друг от друга, несмотря на различную концентрацию инактиватора.

Выделенные участки А, В и С соответствуют низкому ($s^2 < 0.01 \text{ nm}^{-2}$) (А), среднему ($0.01 < s^2 < 0.06 \text{ nm}^{-2}$) (В) и высокому разрешению ($s^2 > 0.06 \text{ nm}^{-2}$) (С). На участке А с самым низким разрешением зависимость $\{\ln I(s), s^2\}$ близка к линейной и расхождение между кривыми невелико. На участке В кривые, представленные треугольниками, смещаются вверх, что объясняется фрагментацией капсида под действием β -пропиолактона (см. электронные микрофотографии вирусов на рис. 2). Разрушение крупных частиц в суспензии и образование более мелких частиц увеличивают относительный вклад последних в общую картину рассеяния; таким образом, агрессивный инактивирующий эффект β -пропиолактона

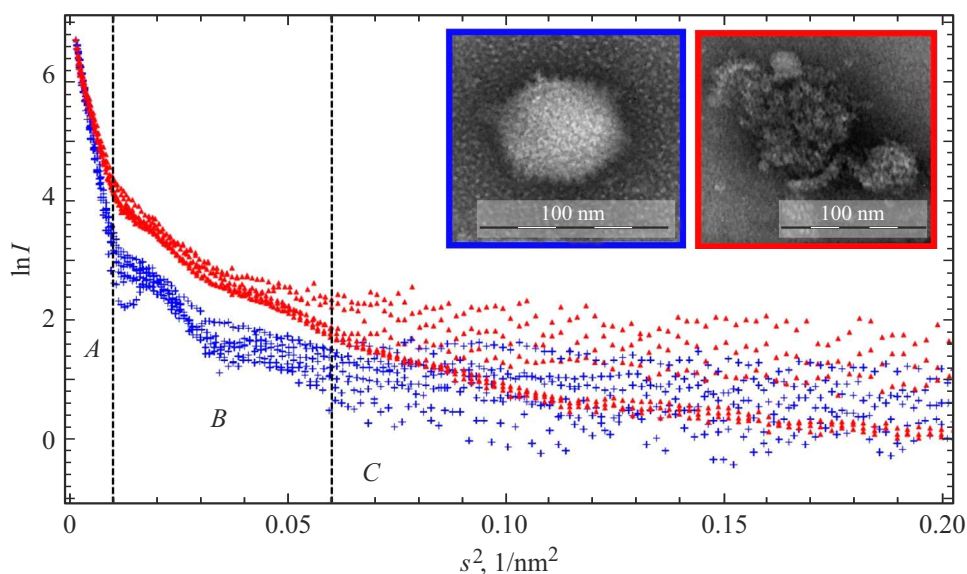


Рис. 3. Сравнение кривых рассеяния от образцов, инактивированных формалином (крестики) и инактивированных β -пропиолактоном (треугольники). На левой вставке приведена фотография образца, инактивированного формалином, на правой — β -пропиолактоном. Соотношения инактиватора и суспензии для каждого образца приведены в таблице.

Характеристики образцов аденовирусов

Номер образца	Вирус	Инактивация (объем:объем)	Результаты измерения концентрации белка, $\mu\text{g/ml}$	Инфекционный титр вируса из пробы
1	Аденовирус 6	Формалин (1:40)	1.01	0
2	Аденовирус 6	Формалин (1:400)	1.07	0
3	Аденовирус 6	Формалин (1:4000)	1.08	0
4	Аденовирус 26	Формалин (1:40)	1.05	0
5	Аденовирус 26	Формалин (1:400)	1.05	0
6	Аденовирус 26	Формалин (1:4000)	1.04	0
7	Аденовирус 6	β -пропиолактон (1:1000)	1.08	0
8	Аденовирус 6	β -пропиолактон (1:10000)	1.04	0
9	Аденовирус 6	β -пропиолактон (1:100000)	1.07	0
10	Аденовирус 26	β -пропиолактон (1:1000)	1.08	0
11	Аденовирус 26	β -пропиолактон (1:10000)	1.04	0
12	Аденовирус 26	β -пропиолактон (1:100000)	1.04	0

лучше всего заметен на участке B. На участке C с самым высоким разрешением обнаруживается присутствие в суспензии мелких фрагментов клеток A-549, в которых

выращивался вирус. Вклад этих фрагментов в общую картину рассеяния становится настолько велик, что перекрывает вклад от интересующих нас более крупных

частиц аденовируса, делая анализ кривых рассеяния невозможным.

Из анализа кривых рассеяния МУРР и электронных микрофотографий следует, что инаktivация β -пропиолактоном приводит к разрушению вирусной частицы, в то время как воздействие формалина не затрагивает общую структуру вириона. Это уточняет наши знания о вирулицидной активности формалина и β -пропиолактона и может оказаться полезным при разработке вакцин. На то, что воздействие β -пропиолактона может изменить общую структуру и поверхностные свойства вирусных частиц, указывалось также в работе [11].

Следует подчеркнуть, что объем данных о структуре инаktivированных вирусов, полученный только с помощью ПЭМ, недостаточен для обоснования результатов настоящего исследования. Для этого необходимо проанализировать тысячи электронных микрофотографий, что не представляется возможным без привлечения алгоритмов машинного обучения. Исследование структуры инаktivированных вирусов с помощью ПЭМ и машинного обучения представляет большой интерес и может быть проведено в будущем. В настоящей работе в качестве метода, позволяющего получать данные о структуре вирусов с большого ансамбля случайно ориентированных частиц, был выбран сравнительно простой и доступный метод МУРР. В то же время исследуемая вирусосодержащая суспензия является полидисперсной системой, т.е. состоящей из объектов неодинаковой формы и размера. Кроме того, нельзя исключать присутствия разрушенных вирусов в образцах, инаktivированных формалином. В связи с этим возникает необходимость в использовании комплиментарного метода МУРР, позволяющего получать дополнительную информацию о структуре инаktivированных вирусных частиц. Таким образом, достоверность результатов настоящего исследования обеспечена сочетанием методов МУРР и ПЭМ и не может быть основана на каком-либо из них в отдельности.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

Финансирование работы

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект 075 15-2021-1349).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] E.B. Pichkur, M.F. Vorovitch, A.L. Ivanova, E.V. Protopopova, V.B. Loktev, D.I. Osolodkin, A.A. Ishmukhametov, V.R. Samygina, *Emerg. Microbes Infect.*, **13** (1), 2313849 (2024). DOI: 10.1080/22221751.2024.2313849
- [2] A. Moiseenko, Y. Zhang, M.F. Vorovitch, A.L. Ivanova, Z. Liu, D.I. Osolodkin, A.M. Egorov, A.A. Ishmukhametov, O.S. Sokolova, *Emerg. Microbes Infect.*, **13** (1), 2290833 (2024). DOI: 10.1080/22221751.2023.2290833
- [3] M. Bingham, T. Pesnot, A.D. Scott, *Prog. Med. Chem.*, **62** (1), 61 (2023). DOI: 10.1016/bs.pmch.2023.10.002
- [4] Д.И. Свергун, Э.В. Штыкова, В.В. Волков, Л.А. Фейгин, *Кристаллография*, **56** (1), 777 (2011). [D.I. Svergun, E.V. Shtykova, V.V. Volkov, L.A. Feigin, *Crystallogr. Rep.*, **56** (1), 725 (2011). DOI: 10.1134/S1063774511050221].
- [5] D. Khaykelson, U. Raviv, *Biophys. Rev.*, **12** (1), 41 (2020). DOI: 10.1007/s12551-020-00617-4
- [6] A.L. Ksenofontov, M.V. Petukhov, V.V. Matveev, N.V. Fedorova, P.I. Semenyuk, A.M. Arutyunyan, T.I. Manukhova, E.A. Evtushenko, N.A. Nikitin, *Biochemistry*, **88** (1), 68 (2023). DOI: 10.31857/S0320972523010050
- [7] S. Watts, M. Ramstedt, S. Salentinig, *J. Phys. Chem. Lett.*, **12** (39), 9557 (2021). DOI: 10.1021/acs.jpclett.1c02327
- [8] A.L. Ksenofontov, M.V. Petoukhov, A.N. Prusov, N.V. Fedorova, E.V. Shtykova, *Biochemistry*, **85** (3), 310 (2020). DOI: 10.1134/S0006297920030062
- [9] E.V. Shtykova, M.V. Petoukhov, N.V. Fedorova, A.M. Arutyunyan, E.V. Skurat, L.V. Kordyukova, A.V. Moiseenko, A.L. Ksenofontov, *Biochemistry*, **86** (2), 230 (2021). DOI: 10.1134/S0006297921020115
- [10] G.S. Peters, O.A. Zakharchenko, P.V. Konarev, Y.V. Karmazikov, M.A. Smirnov, A.V. Zabelin, E.H. Mukhamedzhanov, A.A. Veligzhanin, A.E. Blagov, M.V. Kovalchuk, *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. A*, **945**, 162616 (2019). DOI: 10.1016/j.nima.2019.162616
- [11] C. Fan, X. Ye, Z. Ku, L. Kong, Q. Liu, C. Xu, Y. Cong, Z. Huang, *J. Virol.*, **91** (8), e00038-17 (2017). DOI: 10.1128/jvi.00038-17