

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 578+57.037+57.083

Кинетика термоинактивации вируса гриппа А/BANGKOK/1/1979(H3N2) в присутствии полиаллиламина

Н.А. Контаров^{1,2,*} , Е.И. Долгова² , И.В. Погарская² ,
Е.О. Контарова³ , Н.В. Юминова² 

¹Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет),
Министерство здравоохранения Российской Федерации, Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2;

²Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова,
Россия, 115088, Москва, пер. Малый Казенный, д. 5а;

³Федеральный научно-клинический центр, Федеральное медико-биологическое агентство,
Россия, 115682, Москва, Ореховый бульвар, д. 28

*e-mail: kontarov@mail.ru

В настоящее время все большее место в противовирусной терапии отводится различным полиэлектролитам. Для полиэлектролита полиаллиламина с молекулярной массой 6000 Да показана противовирусная активность в отношении вирусов гриппа, кори, простого герпеса 1-го типа и цитомегаловируса. Ранее нами была определена нетоксическая концентрация полиаллиламина, равная 30 мкМ, при которой сохраняется противовирусный эффект для кори и гриппа, но отсутствует токсическое воздействие на клетки. При этом известно, что одновременное воздействие более выраженному снижению инфекционности вируса. Одним из таких физических факторов является температура, воздействие которой на вирус приводит к его инактивации. Изучение параметров термоинактивации имеет важное практическое значение при разработке противогриппозных вакцин, а также для изучения снижения инфекционной активности вирусных частиц при оседании их на различных поверхностях. В связи с этим особый интерес представляет изучение кинетических и термодинамических характеристик процесса термоинактивации вируса гриппа в присутствии противовирусного соединения полиаллиламина. В настоящей работе мы показали, что процесс термоинактивации вируса гриппа в присутствии полиаллиламина в интервале температур 38–60°C описывается кинетикой реакции первого порядка. Термодинамические параметры термоинактивации указывают на вовлечение в процесс инактивации поверхностных белков вируса гриппа вследствие взаимодействия с ними полиаллиламина. Полученные результаты указывают на возможность использования полиаллиламина в качестве соединения, ускоряющего процесс термической инактивации вируса гриппа.

Ключевые слова: полиэлектролит, полиаллиламин, вирус гриппа, термоинактивация, гемагглютинирующая активность, инфекционность вируса

В настоящее время ужесточаются требования по получению инаktivированных гриппозных вакцин с целью снижения поствакцинальных осложнений. Для инаktivации вирусов гриппа применяют различные физические, химические и биологические методы [1–4]. Применение только физических методов часто бывает недостаточным для инаktivации вакцинного штамма вируса, в связи с чем дополнительно используются различные химические соединения, вызывающие инаktivацию антигенных белков вируса, в частности гемагглютинина, при повышении температуры. При этом происходит снижение гемагглютинирующей активности (ГА) вируса и его инфекционности. В данной работе таким соединением является полиэлектролит (ПЭ) полиалли-

ламин (ПАА) с молекулярной массой 6000 Да, для которого ранее нами был выявлен противовирусный эффект в отношении вирусов кори и гриппа в концентрации 30 мкМ [5], проявляющийся в снижении их инфекционности при отсутствии токсического действия данного ПЭ на клетки.

Материалы и методы

Вирус гриппа. Штамм вируса гриппа А/BANGKOK/1/1979(H3N2) получен из коллекции Научно-исследовательского института вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова (Москва, Россия) в виде вируссодержащей суспензии, материал хранили при температуре -80°C.

Полиэлектролит. В работе использовали ПЭ – гидрохлорид ПАА с молекулярной массой

$M_w = 6000$ Да в конечной концентрации 30 мкМ (Sigma, США). Раствор ПАА в фосфатном буфере имел значение $pH = 7,4$.

Культура клеток. Клетки эпителия почки спаниеля MDCK II выращивали на среде DMEM с добавлением пенициллина (100 ед./мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и 10% фетальной телячьей сыворотки в атмосфере 5% CO_2 при температуре 37°C. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста [8]. В основе этого колориметрического метода лежит способность клеток метаболизировать тетразолиевый краситель МТТ, изменяя его окраску. Интенсивность окрашивания определяли спектрофотометрически через 24 и 48 ч при длине волны 590 нм.

Гемагглютинирующая активность вируса. ГА вируса определяли с помощью реакции гемагглютинации с использованием 1,5%-ой суспензии куриных эритроцитов [9, 10]. Исходная ГА штамма составила 32 ГАЕ/мл (единиц гемагглютинирующей активности/мл).

Инфекционность вируса. Инфекционный титр вируса определяли по количеству фокусобразующих единиц (ФОЕ) и выражали в ФОЕ/мл [11]. Вирусную суспензию добавляли к монослою клеток MDCK II. Концентрация клеток в лунке составляла $5 \cdot 10^4$ клеток. Множественность инфекции составляла 0,01. Инфицирование проводили 1 ч в темноте при комнатной температуре, после чего удаляли вирусную суспензию. Затем клетки выращивали в 5% CO_2 при 37°C в среде DMEM–Avisel с добавлением 1,25% микрокристаллической целлюлозы (Sigma, США), 0,36% бычьего сывороточного альбумина и трипсина, обработанного ингибитором химотрипсина L-тозиламид-2-фенилэтилхлорметилкетон (Sigma, США) в концентрации 1 мкг/мл. Через 29 ч культуральную жидкость сливали, клетки фиксировали в течение 90 мин ледя-

ным 70%-ным этанолом. Затем обрабатывали мышиными антителами к белку NP вируса гриппа, а после – вторичными антимышиными антителами, меченными пероксидазой хрена (Sigma, США). С целью выявления пероксидазы хрена готовили два раствора: первый – диметилформамид – 2,5 мл, 3-амино-9-этилкарбазол – 10 мг, второй – H_2O_2 0,2 мл в 0,2 М ацетатном буфере, $pH = 5,0$. Два раствора смешивают и инкубировали 20 мин при комнатной температуре. Далее плашку сканировали и подсчитывали число ФОЕ. Исходное значение инфекционного титра вируса составило $5,4 \cdot 10^6$ ФОЕ/мл.

Термоинактивация вируса. Термоинактивация вируса гриппа проводилась в отсутствие и при добавлении ПАА в вирусосодержащую суспензию в конечной концентрации 30 мкМ. Инкубация проходила в диапазоне температур 45–60°C для определения снижения по отношению к исходной, принятой за 100%, ГА (ГАЕ, %) в течение 60 мин и при температуре 38–60°C для определения снижения по отношению к исходному, принятому за 100%, инфекционного титра (ФОЕ, %) в течение 180 мин. Все эксперименты с вирусом гриппа проводились в лаборатории детских вирусных инфекций отдела вирусологии НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова. Статистическую обработку результатов, полученных из четырехкратных повторов каждого эксперимента, проводили с помощью параметрического t-критерия Стьюдента при доверительной вероятности 0,95 в Excel 2010 (Microsoft Office). Аппроксимацию кинетических кривых также проводили в Excel 2010.

Результаты и обсуждение

Как следует из приведенных на рис. 1 (А, Б) кинетических кривых для ГА и инфекционного

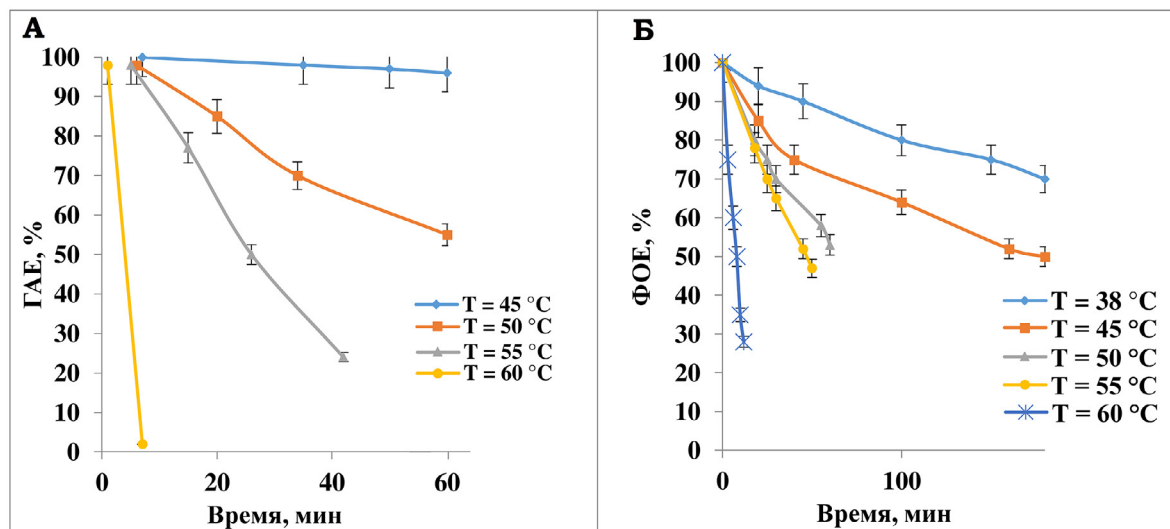


Рис. 1. Графическая оценка термической инактивации. А – изменение гемагглютинирующей активности вируса гриппа A/BANGKOK/1/1979(H3N2) в присутствии 30 мкМ ПАА, $pH = 7,4$. Ось абсцисс – время, мин; ось ординат – ГАЕ, %. Б – изменение инфекционной активности вируса гриппа A/BANGKOK/1/1979(H3N2) в присутствии 30 мкМ ПАА, $pH = 7,4$. Ось абсцисс – время, мин; ось ординат – ФОЕ, %.

титра вируса гриппа, процесс термоинактивации в присутствии 30 мкМ ПАА описывается кинетикой реакции первого порядка:

$$R \xrightarrow{k_{in}} R_{in}, \tag{1}$$

$$\ln\left(\frac{[R_t]}{[R_0]}\right) = -k_{in}t, \tag{2}$$

где R и R_{in} – активная и инактивированная формы вируса соответственно, $[R_t]$ – ГА и инфекционный титр вируса в момент времени t процесса термоинактивации в присутствии 30 мкМ ПАА, $[R_0]$ – исходная ГА и инфекционный титр, k_{in} – константа скорости термоинактивации, мин⁻¹, которую находили с помощью аппроксимации кинетических зависимостей термоинактивации экспоненциальными функциями с показателем экспоненты – $-k_{in}t$. В табл. 1, 2 приведены значения констант скоростей термоинактивации в присутствии 30 мкМ ПАА и без добавления ПЭ. Из результатов, приведенных в табл. 1, 2 видно, что константы скорости термоинактивации в присутствии 30 мкМ ПАА выше, чем при инактивации в отсутствие ПЭ. Это может быть объяснено инактивирующим вкладом ПАА, связываю-

щимся с поверхностными белками вириона, в процесс термоинактивации, что приводило к увеличению скорости снижения ГА и инфекционного титра вируса. Используя кинетические параметры термоинактивации вируса гриппа и теорию активированного комплекса Эйринга, определили термодинамические параметры термоинактивации в присутствии и в отсутствие ПАА: активационные энтальпия $\Delta H^\ddagger$ и энтропия $\Delta S^\ddagger$ (рис. 2):

$$k_{in} = \frac{k_b T}{h} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}} e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}}, \tag{3}$$

где T – температура, k_b – постоянная Больцмана, равная $1,38 \cdot 10^{-23}$ Дж/К, h – постоянная Планка, равная $6,62 \cdot 10^{-34}$ Дж·с.

Значения активационной энтальпии и энтропии в отсутствие ПАА для ГА и инфекционности вируса составили: $\Delta H_1^\ddagger = -124,5 \pm 8,1$ кДж/моль, $\Delta H_2^\ddagger = -141,27 \pm 4,6$ кДж/моль; $\Delta S_1^\ddagger = 63,14 \pm 1,8$ кДж/К·моль, $\Delta S_2^\ddagger = 104,75 \pm 5,4$ кДж/К·моль соответственно. Значения активационной энтальпии и энтропии в присутствии 30 мкМ ПАА для ГА и инфекционности вируса были следующими: $\Delta H_1^\ddagger = -373,95 \pm 14,7$ кДж/моль, $\Delta H_2^\ddagger =$

Таблица 1

Константы скорости термоинактивации вируса гриппа в отсутствие ПАА

$k_{in}, \text{мин}^{-1}$	$T = 38^\circ\text{C}$	$T = 45^\circ\text{C}$	$T = 50^\circ\text{C}$	$T = 55^\circ\text{C}$	$T = 60^\circ\text{C}$
Термоинактивация гемагглютинирующей активности вируса ($p < 0,05$)	–	$(2,780,05) \cdot 10^{-5}$	$(1,510,024) \cdot 10^{-4}$	$(3,430,062) \cdot 10^{-4}$	$(2,320,05) \cdot 10^{-4}$
Термоинактивация инфекционности вируса ($p < 0,05$)	$(2,870,048) \cdot 10^{-6}$	$(1,320,01) \cdot 10^{-5}$	$(3,290,061) \cdot 10^{-5}$	$(4,500,078) \cdot 10^{-5}$	$(1,300,02) \cdot 10^{-5}$

Таблица 2

Константы скорости термоинактивации вируса гриппа в присутствии 30 мкМ ПАА

$k_{in}, \text{мин}^{-1}$	$T = 38^\circ\text{C}$	$T = 45^\circ\text{C}$	$T = 50^\circ\text{C}$	$T = 55^\circ\text{C}$	$T = 60^\circ\text{C}$
Термоинактивация гемагглютинирующей активности вируса ($p < 0,05$)	–	$(8,00,09) \cdot 10^{-5}$	$(1,100,02) \cdot 10^{-3}$	$(4,00,06) \cdot 10^{-2}$	$(6,50,08) \cdot 10^{-2}$
Термоинактивация инфекционности вируса ($p < 0,05$)	$(2,00,04) \cdot 10^{-3}$	$(4,010,07) \cdot 10^{-3}$	$(1,900,022) \cdot 10^{-2}$	$1,50 \cdot 10^{-2}$	$(1,050,02) \cdot 10^{-1}$

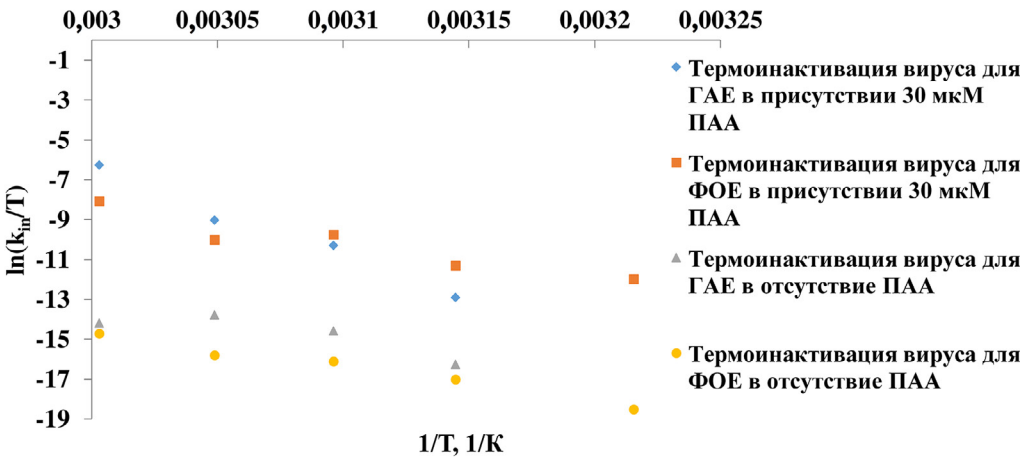


Рис. 2. Определение энтальпии и энтропии термоинактивации вируса гриппа A/BANGKOK/1/1979(H3N2) в присутствии 30 мкМ ПАА и без добавления ПАА, рН = 7,4 Ось абсцисс – $1/T, 1/K$; ось ординат – $\ln(k_{in}/T)$.

$= -142,93 \pm 4,8$ кДж/моль; $\Delta S_1^\ddagger = 871,4 \pm 21,2$ кДж/К·моль, $\Delta S_2^\ddagger = 160,44 \pm 5,8$ кДж/К·моль соответственно. Полученные значения термодинамических параметров термоинактивации можно интерпретировать следующим образом. Высокие отрицательные значения активационной энтальпии для ГА и инфекционного титра указывают на наличие процесса инактивации поверхностных белков вириона, причем более высокое значение активационной энтальпии для инфекционного титра связано с вовлечением в процесс снижения инфекционной активности вируса только белковых структур без включения в процесс рибонуклеопротеина. Высокие положительные значения активационной энтропии характерны при наличии гидрофобного эффекта в процессе инактивации поверхностных гликопротеинов вириона. Показатели активационной энтальпии термоинактивации вируса в присутствии 30 мкМ ПАА значительно выше для ГА, а для инфекционного титра значимо не отличаются от таковой для термоинактивации в отсутствие ПАА. Это объясняется взаимодействием ПАА с поверхностными гликопротеинами вириона гриппа, вносящим дополнительный энергетический вклад в процесс термоинактивации. Примерно одинаковые значения активационной энтропии для инфекционного титра могут объясняться наличием взаимодействия ПАА не только с поверхностными белками, но и с рибонуклеопротеином вируса. Высокое положительное значение активационной энтропии термоинактивации ГА вируса в присутствии ПАА связано с процессом дегидратации поверхностных белков при их инактивации. Дополнительную информацию о термодинамическом вкладе ПАА в процесс дегидратации поверхностных гликопротеинов при термоинактивации вируса может дать значение инкремента молярной теплоемкости Δc_p . Зная активационную энтропию и используя формулу (4), можно рассчитать инкремент молярной теплоемкости термоинактивации ГА и инфекционного титра вируса:

$$\Delta S_T^\ddagger = \Delta S_m^\ddagger + \Delta c_p \ln \left(\frac{T}{T_m} \right), \quad (4)$$

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bhatia S., Lauster D., Bardua M., Ludwig K. Linear polysialoside outperforms dendritic analogs for inhibition of influenza virus infection *in vitro* and *in vivo* // *Biomaterials*. 2017. Vol. 138. P. 22–34.
2. Sundararajana A., Ganapathya R., Huana L., Dunlapb J. Influenza virus variation in susceptibility to inactivation by pomegranate polyphenols is determined by envelope glycoproteins // *Antiviral*. 2010. Vol. 88. N 1. P. 1–9.
3. Tuladar E., Bouwknecht M., Zwietering M.H., Koopmans M., Duizer E. Thermal stability of structurally

где $\Delta S_T^\ddagger$ – изменение активационной энтропии для температуры T , $\Delta S_T^\ddagger$ – изменение активационной энтропии для температуры T_m , $T_m = 334$ К.

По графическим зависимостям уравнения (4) $\Delta S_T^\ddagger$ от T были определены значения инкремента молярной теплоемкости Δc_p как угловые коэффициенты уравнений линейной аппроксимации. Полученные значения Δc_p отрицательны и равны: $\Delta c_{p1} = -1,14 \pm 0,08$ кДж/К·моль и $\Delta c_{p2} = -0,44 \pm 0,06$ кДж/К·моль для термоинактивации ГА и инфекционного титра вируса гриппа соответственно. Отрицательные значения инкремента молярной теплоемкости для термоинактивации ГА вируса указывают на наличие перехода «клубок-дегидратированная расплавленная глобула» [7] в присутствии 30 мкМ ПАА. Полученные данные соответствуют значениям активационной энтропии для термоинактивации ГА вируса.

Борьба с пандемиями гриппа и других респираторных оболочечных вирусов, в том числе COVID-19, требует разработки новых методов профилактики острых респираторных вирусных инфекций, в том числе химиопрепаратов, оказывающих инактивирующее действие на все антигенные белки вируса. Отдельного внимания заслуживает одновременное применение физических и химических факторов инактивации вирусов. Полученные нами результаты показывают, что использование ПАА в совокупности с повышенной температурой вызывает эффективную и достаточно быструю инактивацию вируса гриппа, при этом используемый ПЭ оказывает инактивирующее действие в отношении всех поверхностных гликопротеинов вириона. Применение ПАА совместно с температурной инактивацией вируса может найти применение в технологии получения инаktivированных, в том числе инаktivированных цельновирионных вакцин против гриппа.

Работа выполнена в рамках программы «Russian Academic Excellence Project 5-1». Исследования проведены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

different viruses with proven or potential relevance to food safety // *J. Appl. Microbiol.* 2012. Vol. 112. N 5. P. 1050–1057.

4. Wang W., Song H.S., Keller P.W., Alvarado-Facundo E., Vassell R., Weiss C.D. Conformational stability of the hemagglutinin of H5N1 influenza A viruses influences susceptibility to broadly neutralizing stem antibodies // *J. Virol.* 2018. Vol. 92. N 12: e00247–18.

5. Контаров Н.А., Ермакова А.А., Гребенкина Н.С., Юминова Н.В., Зверев В.В. Изучение противовирусной

активности полиэлектролитов в отношении вируса гриппа // *Вопр. вирусол.* 2015. Т. 60. № 4. С. 5–9.

6. Joly M. A physico-chemical approach to the denaturation of proteins. L.; N.Y.: Academic Press, 1965. 350 pp.

7. Потехин С.А. Сканирующая микрокалориметрия при высоком давлении — новый метод исследования конформационных и фазовых // *Усп. биол. хим.* 2018. Т. 58. С. 285–312.

8. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Methods.* 1983. Vol. 65. N.1–2. P. 55–63.

9. Wegmann T.G., Smithies O. Improvement of the microtiter hemagglutination // *Method. Transfusion.* 1966. Vol. 8. N. 1. P. 67–73.

10. Pleshka S., Stein M., Schoop R., Hudson J.B. Antiviral properties and more of action of standardized Echinacea purpurea extract against highly pathogenic avian influenza virus (H5N1, H7N7) and swine-origin H1N1 (S-OIV) // *Virol. J.* 2009. Vol. 6: 197.

11. Payne A.F., Binduga-Gajewska I., Kauffman E.B., Kramer L.D. Antiviral activity of binase against the pandemic influenza A (H1N1) virus // *J. Virol. Meth.* 2006. Vol. 134. N. 1–2. P. 183–189.

Поступила в редакцию 18.09.2020 г.

После доработки 21.01.2021 г.

Принята в печать 02.02.2021 г.

SHORT COMMUNICATION

Thermoinactivation kinetics of strain A/BANGKOK/1/1979(H3N2) influenza virus in the presence of polyallylamine

N.A. Kontarov^{1,2,*} , E.I. Dolgova² , E.O. Kontarova³ ,
I.V. Pogarskaya² , N.V. Yuminova² 

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Health of the Russian Federation, Trubetskaya ul. 8–2, Moscow, 119991, Russia;

²I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Maliy Kazenny per. 5a, Moscow, 115088, Russia;

³Federal Research and Clinical Center, Federal Medical and Biological Agency, Orekhovy bulv. 28, Moscow, 115682, Russia

*e-mail: kontarov@mail.ru

Currently, an increasing place in antiviral therapy given to various polyelectrolytes. For polyelectrolyte polyallylamine with a molecular weight of 6000 Da, antiviral activity shown against influenza viruses, measles, herpes simplex type 1 and cytomegalovirus. A non-toxic concentration of 30 was determined, at which the antiviral effect for measles and flu is preserved, but there is no toxic effect on cells. At the same time, it known that the simultaneous effect of physical environmental factors and chemical compounds on the virus contributes to a more pronounced decrease in the infectivity of the virus. One of these physical factors is the temperature, the effect of which on the virus leads to its inactivation. The study of thermal inactivation parameters is of great practical importance in the development of influenza vaccines, as well as for studying the decrease in the infectious activity of viral particles when they settle on various surfaces. In this connection, it is of particular interest to study the kinetic and thermodynamic characteristics of the process of thermal inactivation of the influenza virus in the presence of the antiviral compound polyallylamine. In this paper, we have shown that the process of thermal inactivation of the influenza virus in the presence of polyallylamine in the temperature range 38–60°C described by the first-order reaction kinetics. Thermodynamic parameters of thermal inactivation indicate the involvement of surface proteins of the influenza virus in the process of inactivation as result of the interaction of polyallylamine with them. The results obtained indicate the possibility of using polyallylamine as a compound that accelerates the process of thermal inactivation of the influenza virus.

Keywords: polyelectrolyte, polyallylamine, influenza virus, thermal inactivation, hemagglutinating activity, viral infectivity

Funding: The research was performed within the framework of the “Russian Academic Excellence Project 5-1” program.

Сведения об авторах

Контаров Николай Александрович — канд. биол. наук, доц. кафедры медицинской и биологической физики лечебного факультета первого МГМУ имени И.М. Сеченова. Тел.: 8-499-674-01-99; e-mail: kontarov@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0030-4867>

Долгова Екатерина Игоревна — мл. науч. сотр. лаборатории детских вирусных инфекций отдела вирусологии НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова. Тел.: 8-499-674-01-99; e-mail: doc.ekaterina.dolgova@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8985-7569>

Контарова Елена Олеговна — канд. мед. наук, врач лабораторной диагностики Федерального научно-клинического центра Федерального медико-биологического агентства (Больница №83). Тел.: 8-499-725-44-40; e-mail: kontarova@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3580-6277>

Погарская Ирина Владимировна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории детских вирусных инфекций отдела вирусологии НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова. Тел.: 8-499-674-01-99; e-mail: kozyl_i_v@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5550-7875>

Юминова Надежда Васильевна — докт. биол. наук, зав. лаборатории детских вирусных инфекций отдела вирусологии НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова. Тел.: 8-499-674-01-99; e-mail: yuminova@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7723-4038>