

© Коллектив авторов

## ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ ПОЛИОМИЕЛИТА, ИНАКТИВИРОВАННЫХ ХИМИЧЕСКИМ СПОСОБОМ И ИОНИЗИРУЮЩИМ ИЗЛУЧЕНИЕМ

Л.Е. Агафонова<sup>1\*</sup>, В.В. Шумянцева<sup>1,2</sup>, Ю.Ю. Ивин<sup>1,3</sup>, А.Н. Пиняева<sup>1,3</sup>, А.А. Ковпак<sup>3</sup>,  
А.А. Ишмухаметов<sup>3</sup>, С.В. Будник<sup>4</sup>, Р.С. Чурюкин<sup>4</sup>, Д.Д. Жданов<sup>1</sup>, А.И. Арчаков<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,  
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; \*эл. почта: agafonovaluba@mail.ru

<sup>2</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова,  
117997, Москва, ул. Островитянова, 1

<sup>3</sup>Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов  
имени М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита),  
108819, Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корп. 1  
<sup>4</sup>“Теокортекс”, 108808, Москва, поселение Первомайское, кв-л 328, 34, стр. 6

Электрохимическое профилирование вирусных частиц полиомиелита, инаktivированных формальдегидом, продемонстрировало взаимосвязь между концентрацией белков D-антигена и интенсивностью максимальной амплитуды токов образцов полиовирусов. Это позволило идентифицировать сигнал как электрохимическое окисление поверхностных белков полиовируса. Используя регистрацию процессов электроокисления аминокислот, входящих в состав капсидных белков, проведён сравнительный электрохимический анализ вирусных частиц полиомиелита, инаktivированных ускоренными электронами в дозах 5 кГр, 10 кГр, 15 кГр, 25 кГр, 30 кГр при комнатной температуре. Увеличение дозы облучения сопровождалось увеличением сигналов электроокисления. Существенный рост сигналов электроокисления белков капсида полиовируса был выявлен при облучении в дозах 15–30 кГр. Полученные данные позволяют предположить, что изменение профиля и рост сигналов электроокисления белков капсида полиовируса связан с увеличением степени структурной реорганизации поверхностных белков и недостаточной сохранностью D-антигена при данных условиях инаktivации полиовируса.

**Ключевые слова:** электрохимическое профилирование; полиовирус; псевдовирус; полиомиелит; инаktivация; функциональная характеристика

**DOI:** 10.18097/PBMC20247003161

### ВВЕДЕНИЕ

Актуальность получения и исследования псевдовиральных конструкций обусловлена их применением в ряде областей фундаментальной биологии и биомедицины. Псевдовиральные конструкции нашли широкое применение в качестве основного компонента для создания вакцин [1–4] и генотерапевтических векторов в биотехнологии [5, 6]. Псевдовиральная модель является предпочтительным объектом для точного анализа фенотипа белков оболочки вирусов, подверженных быстрому накоплению мутаций *in vivo* [6]. С помощью псевдовирусов исследуют молекулярные детерминанты патогенности вирусов [6]. Альтернативой для заместительной ферментной терапии являются нанореакторы, основанные на инкапсуляции фермента внутри вирусоподобных частиц [7]. Вирусоподобные частицы являются биоразлагаемыми, единообразно организованными и пористыми наноструктурами/наноконтейнерами, которые транспортируют и защищают биокатализатор (фермент) от воздействия внешней среды, не оказывая существенного влияния на биологическую активность [7]. Для этого фермент инкапсулируют внутри капсида, и затем поверхность нанореактора может быть функционализирована специфическими лигандами для нацеливания на определённые рецепторы, клетки или ткани [7].

Псевдовиральные (инаktivированные) частицы получают инаktivацией вирусов различными химическими (обработка формальдегидом,  $\beta$ -пропиолактоном) и физическими (облучением волнами и частицами различной природы) методами. Инаktivация направлена на разрушение генетического материала (ДНК или РНК) вируса с целью полного подавления его способности к размножению, но с сохранением белковой части для выработки антител к полученному псевдовирусу [3, 8–11].

В литературе описан электрохимический анализ различных вирусов на основе геносенсорных и иммуносенсорных подходов [3, 12–16]. Электрохимические стратегии выявления вирусов либо по РНК, либо по вирусным белкам или антителам основаны на измерении сигналов с помощью медиаторов электронного переноса, электроактивных и ферментативных меток, а также с использованием различных модификаций рабочих электродов для увеличения электроактивной площади и усиления сигнала. Прямой электроанализ вирусных частиц на основе электрохимического профилирования биомолекул в литературе не описан. Ранее мы применяли сравнительное электрохимическое профилирование трансфицированных клеток и ДНК для исследования процессов трансфекции и анализа фрагментации ДНК при воздействии ферментов рестрикции и при апоптозе [17, 18].

Целью настоящей работы было прямое электрохимическое профилирование вирусных частиц полиомиелита, подвергнутых инаktivации различными дозами ионизирующего излучения (ускоренными электронами) и обработанных формальдегидом. В связи с поставленной целью сформулированы следующие задачи:

- провести сравнительный анализ электрохимических профилей вирусных частиц полиомиелита, инаktivируемых химическим способом и ионизирующим излучением;
- охарактеризовать природу регистрируемого сигнала на основе данных электроанализа;
- рассчитать электрохимические параметры (потенциал, максимальную амплитуду тока и площадь пика) из электрохимических профилей;
- проанализировать изменения электрохимических параметров в зависимости от условий инаktivации.

## МЕТОДИКА

### *Клетки и вирусы*

В качестве клеточной системы для наработки вирусного материала использовали культуру клеток линии Vero 10-87. Партии культуры-продуцента готовили из клеточного пула аттестованного рабочего банка клеток Vero (РБК Vero, Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Россия).

Аттенуированные штаммы Сэбина вируса полиомиелита типа 1 (штамм LSc 2ab, далее — SI) и типа 3 (штамм Leon 12a1b, далее — SIII) использовали для получения образцов и для постановки реакции нейтрализации. Используемый в работе вирусный материал получали из исходных штаммов путём пассирования в клетках Vero. Клетки культивировали в биореакторе с использованием микроносителей Cytodex 1 (“Cytiva”, США) в питательной среде Игла MEM (Институт полиомиелита) с 5% сывороткой крови эмбрионов коров (“LTBiotech”, Литва). Далее питательную среду Игла MEM заменяли средой поддержки (среда 199 без добавления сыворотки) и проводили заражение клеток необходимым штаммом вируса полиомиелита. Вирус культивировали при температуре 34°C до полной деградации монослоя клеток Vero на микроносителях и проводили сбор вирусной суспензии. Суспензию фильтровали с помощью каскадов фильтров рейтингом (с размерами пор) 70 мкм — 0,65/0,45 мкм — 0,22 мкм. Осветлённую вирусную суспензию концентрировали в 200–500 раз с помощью процедуры ультрафильтрации в тангенциальном потоке с использованием мембраны с отсечением 100 кДа [19, 20].

### *Инаktivация вирусов*

В работе исследовали псевдовиральные частицы — вирусные частицы полиомиелита, подвергнутые инаktivации формальдегидом и различным дозам ионизирующего излучения (ускоренными электронами).

Для инаktivации формальдегидом концентраты полиовирусов очищали с помощью хроматографических процедур (гель-фильтрация и ионообменная хроматография) [21, 22] и инкубировали с формальдегидом в концентрации 0,025% в течение 13 суток при температуре 37°C. После инаktivации образцы подвергали процедуре диализа и переводили в фосфатно-солевой буферный раствор (“PanEco”, Россия) [20].

Для проведения инаktivации полиовируса ионизирующим излучением использовали образцы с титром вируса  $10^{10}$  ТЦД<sub>50</sub>/мл. Образцы с вирусным материалом фасовали по 3–4 мл в 5 мл криопробирки и помещали в герметичные контейнеры. Облучение образцов проводили в дозах 5–30 кГр при комнатной температуре на импульсном линейном ускорителе электронов с мощностью 15 кВт и энергией электронов 10 МэВ. Облучение проводили с одной стороны. Поглощённая доза набиралась за один цикл облучения (не дробно). Образцы поступали на участок облучения по роликовому конвейеру в герметичных транспортных контейнерах; время нахождения “под лучом” — от 0,2 с до 2 с. Для проведения дозиметрических исследований использовали детектор поглощённой дозы утверждённого типа — стандартный образец поглощённой дозы фотонного и электронного излучений (сополимер с феназиновым красителем) СО ПД (Ф) Р-5/50, паспорт стандартного образца утверждённого типа ГСО 7865-2000, партия № 22.57. Для определения поглощённой дозы использовали спектрофотометр ПЭ-5400УФ (“Экрос”, Россия). Фактические поглощённые дозы составляли: 5,2±0,5 кГр, 11,4±1,4 кГр, 15,0±1,8 кГр, 23,3±2,8 кГр, 30,4±3,7 кГр.

### *Анализ остаточной инфекционности образцов вирусов*

Эффективность проведённой инаktivации анализировали титрованием образцов на чувствительной культуре клеток Нер-2 (Cincinnati), полученной из NIBSC (“Национальный институт биологических стандартов и контроля”, Великобритания) по 50-процентному цитопатическому действию (ТЦД<sub>50</sub>) [23], а также с помощью проведения серии пассажей на чувствительной культуре клеток Vero и оценке состояния клеточного монослоя [24]. Клетки Нер-2 выращивали в среде Игла MEM с двойным набором аминокислот и витаминов, клетки Vero — в питательной среде ДМЕМ. В обоих случаях в среду культивирования добавляли 5% эмбриональной телячьей сыворотки (“Биолот”, Россия), стрептомицин (0,1 мг/мл) и пенициллин (100 ед/мл) (“PanEco”, Россия).

### *Анализ содержания D-антигена*

Анализ содержания D-антигена вируса полиомиелита проводили с использованием ИФА тест-системы на основе очищенных поликлональных антител кролика, специфичных к D-антигену. В 96-луночной панели (“Corning”, Германия) сорбировали аффинно очищенный глобулин класса G (Ig G) к вирусу полиомиелита (получен посредством иммунизации кроликов очищенным

антигеном и дальнейшей очистки с помощью аффинной хроматографии) в течение 20 ч при температуре 2–8°C. После процедуры сорбции проводили двукратную отмывку лунок с помощью промывочного раствора (0,01 М фосфатно-солевой буфер, pH 7,4, с 0,05% Tween 20). После удаления промывочного раствора проводили процедуру блокировки с помощью блокирующего раствора (0,01 М фосфатно-солевой буфер, pH 7,4, с 1 % эмбриональной телячьей сывороткой) в течение 1 ч при температуре 37°C. Исследуемые образцы, разведенные в ИФА-буфере (0,01 М фосфатно-солевой буфер, pH 7,4, с 0,05% Tween 20 и 1% эмбриональной телячьей сывороткой), добавляли в лунки планшета и инкубировали в течение 2 ч при температуре 37°C. Производили двукратную отмывку промывочным буфером. Для детекции D-антигена использовали Ig G, конъюгированный с биотином, к вирусу полиомиелита соответствующего типа (получен посредством иммунизации кроликов очищенным антигеном, дальнейшей очистки с помощью аффинной хроматографии и биотинилированием), с которым образцы в лунках инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C, после чего проводили отмывку промывочным буферным раствором. В лунки добавляли конъюгат стрептавидина с пероксидазой (“Sigma”, США) и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C, после чего проводили двукратную отмывку промывочным буферным раствором. Для детекции использовали раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ, кат. № Т0440, “Sigma”), который инкубировали в течение 15 мин. Результаты регистрировали с использованием спектрофотометра для микропланшетов iMark (“Bio-Rad”, США). В качестве стандартного образца использовали образец с известным содержанием D-антигена, измеренным с использованием международного стандарта NIBSC (“Национальный институт биологических стандартов и контроля”, Великобритания).

#### *Электрохимический анализ*

Электрохимические измерения проводили на потенциостате PalmSens (“PalmSens BV”, Нидерланды) с программным обеспечением PSTrace (версия 5.8). В работе использовали трёхконтактные электроды (ПГЭ), полученные методом трафаретной печати (“КолорЭлектроникс”, Россия), с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами, хлоридсеребряным электродом сравнения. Диаметр рабочего электрода составлял 0,2 см (площадь 0,0314 см<sup>2</sup>). Все потенциалы приведены относительно хлоридсеребряного электрода сравнения (отн. Ag/AgCl).

Однозамещенный фосфат калия и хлорид натрия (“Реахим”, Россия) использовали для приготовления 0,1 М калий-фосфатного буфера, pH 7,4, содержащего 0,05 М NaCl (КФБ). Рабочий электрод модифицировали 2 мкл водной дисперсии (0,75±0,05) мг/мл одностенных углеродных нанотрубок (УНТ), стабилизированных карбоксиметилцеллюлозой (ПГЭ/УНТ, “OCSiAl”,

Россия). Электроды отсушивали в течение 30 мин при комнатной температуре, затем проводили их предобработку (4 скана в рабочем диапазоне потенциалов). На модифицированный УНТ электрод наносили 2 мкл аналита и инкубировали 24 ч при 4°C. Затем на электрод наносили 60 мкл электролитного КФБ буфера и проводили измерения в горизонтальном режиме в аэробных условиях при комнатной температуре. Для анализа электрохимических профилей использовали метод квадратно-волновой вольтамперометрии (КВВА) в диапазоне потенциалов (0,0 ÷ 1,2) В с шагом потенциала 5 мВ, амплитудой 20 мВ и частотой 10 Гц.

Для обработки значений интенсивности сигналов применяли программу PSTrace с коррективкой по базовой линии. Электрохимическими параметрами служили численные значения максимальной амплитуды тока пика окисления (в микроамперах, мкА) и площадь пика (в мкА×В) при соответствующих потенциалах (в Вольтах, В). Все приведённые электрохимические данные представляют результаты трёх параллельных экспериментов.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

С помощью электрохимического анализа регистрируют белковые молекулярные профили (сигнатуры) и нуклеотидные молекулярные профили (после выделения ДНК, РНК) клеток [17, 18]. Сравнительный электроанализ псевдовирусных частиц позволяет оценить влияние природы химических реагентов или инактивационных параметров электронного облучения на полиовирусы. Полученные сравнительные электрохимические профили полиовирусов отражают нарушение конформации и, как следствие, изменение экспонируемости капсидных белков вирусов для процесса электрохимического окисления входящих в состав белков аминокислотных остатков.

#### *Электроанализ образцов, подвергнутых химической инактивации*

Электрохимические профили штаммов Сэбина вируса полиомиелита типа 1 (штамм LSc 2ab, SI) и типа 3 (штамм Leon 12a1b, SIII), инактивированные формальдегидом, исследованы методом КВВА (рис. 1) на основе электроокисления аминокислотных остатков, входящих в состав белкового капсида.

Из полученных данных рассчитаны количественные электрохимические параметры (максимальная амплитуда тока и площадь пика при соответствующих потенциалах, таблица 1).

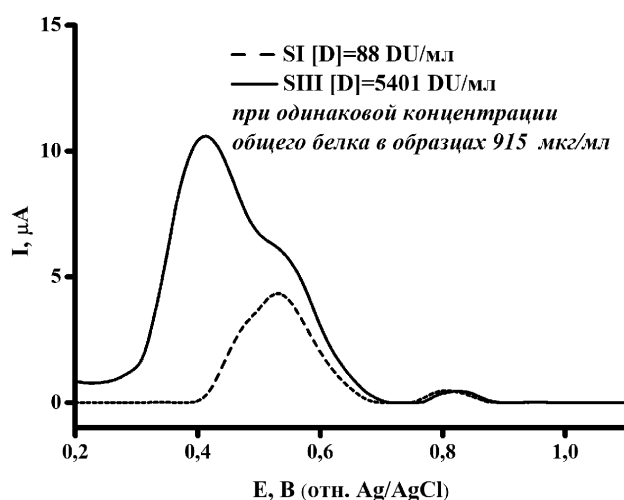
Электрохимический профиль штамма Сэбина вируса полиомиелита типа 1 (SI) содержал два пика электроокисления с максимумом при потенциалах 0,53±0,01 В и 0,81±0,01 В (рис. 1, табл. 1). Электроанализ белковых молекулярных отпечатков штамма Сэбина вируса полиомиелита типа 3 (SIII) показал более сложный характер профиля электроокисления по сравнению со штаммом вируса полиомиелита типа 1 (SI) (рис. 1, табл. 1). Для штамма

## ЭЛЕКТРОАНАЛИЗ ПСЕВДОВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ ПОЛИОМИЕЛИТА

**Таблица 1.** Сравнительные электрохимические параметры штаммов Сэбина вируса полиомиелита типа 1 (штамм LSc 2ab, SI) и типа 3 (штамм Leon 12a1b, SIII), инаktivированных формальдегидом

**[общий белок в образцах]/915 мкг/мл	Электрохимические параметры (максимальная амплитуда тока, $I_{ок}$ , мкА, и площадь пика окисления, S, мкА×В при соответствующих потенциалах ( $E_{ок}$ , В) и *концентрация D-антигена, [D], DU/мл		
		SI	SIII
1 пик	$E_{ок}$	0,53±0,01	0,42±0,01
	$I_{ок}$	4,52±0,40	9,51±0,85
	S	0,66±0,17	1,88±0,23
	[D]	88	5401
2 пик	$E_{ок}$	0,81±0,01	0,83±0,01
	$I_{ок}$	0,530±0,064	0,526±0,090
	S	0,039±0,006	0,040±0,009

Примечание: \* – концентрация D-антигена определена с помощью ИФА-анализа; \*\* – общий белок в образцах полиовирусов определён по методу Лоури.



**Рисунок 1.** Квадратно-волновые вольтамперограммы штаммов Сэбина вируса полиомиелита типа 3, штамм Leon 12a1b, (ПГЭ/УНТ/SIII, сплошная кривая) и типа 1, штамм LSc 2ab, (ПГЭ/УНТ/SI, пунктирная кривая) с разным содержанием D-антигена при одинаковой концентрации общего белка. Квадратно-волновые вольтамперограммы скорректированы по базовой линии.

вируса полиомиелита типа 3 (SIII) зарегистрированы два пика с максимумом при смещённом в катодную область потенциала первого пика  $0,42\pm0,01$  В, что свидетельствует о термодинамически более выгодном процессе электроокисления на электроде, с широким “плечом” при  $0,53\pm0,01$  В и практически неизменном потенциале второго пика  $0,83\pm0,01$  В (рис. 1, и табл. 1). Была выявлена взаимосвязь между концентрацией белков D-антигена и интенсивностью максимальной амплитуды токов электрохимического окисления штаммов вируса полиомиелита. Полученные сравнительные электрохимические параметры образцов SI и SIII (рис. 1) с разным содержанием D-антигена при одинаковой концентрации общего белка позволяют идентифицировать регистрируемый сигнал как электроокисление именно поверхностных белков капсида в исследованных образцах полиовирусов.

### *Электроанализ образцов, подвергнутых облучению ускоренными электронами*

Методом КВВА исследованы пилотные образцы вируса полиомиелита типа 1 (штамм LSc 2ab, SI) в исходной концентрации  $10^{10}$  частиц/мл ( $10^{10}$  ТЦД<sub>50</sub>/мл) после инаktivации ускоренными электронами в дозах 5 кГр, 10 кГр, 15 кГр, 25 кГр, 30 кГр при комнатной температуре. Электроанализ образцов вирусов полиомиелита основан на регистрации электроокисляемых аминокислотных остатков, входящих в состав поверхностных белков капсида [25].

Электрохимическое профилирование образцов SI вируса показало наличие широкого пика электроокисления в области потенциалов (0,3 ÷ 0,8) В с максимумом при потенциале  $0,50\pm0,01$  В, что характерно для электрохимического окисления белковых молекул [17, 25]. По полученным данным максимальных амплитуд токов окисления аминокислотных остатков, входящих в поверхностные белки капсида (табл. 2) вируса полиомиелита типа 1, построена диаграмма (рис. 2), показывающая увеличение интенсивности тока с ростом дозы облучения вследствие изменения/нарушения конформации белковой оболочки полиовируса, которая, вероятно, стала более доступной для электроокисления на электроде.

Из таблицы 2 и диаграммы рисунка 2 следует, что облучение дозами 5–30 кГр приводит к регистрации токов в диапазоне 6,7–13,5 мкА при потенциалах  $E=0,50\pm0,01$  В. Существенный рост сигналов ( $I_{ок}$ , S) электроокисления белков капсида полиовируса обнаружен при облучении в дозах 15–30 кГр, что может свидетельствовать об увеличении степени структурной реорганизации поверхностных белков и подтверждается данными ИФА о плохой сохранности D-антигена при данных условиях инаktivации полиовируса.

По данным ИФА анализов, исходная концентрация D-антигена в образцах вируса полиомиелита типа 1 (штамм LSc 2ab) составила 740 DU/мл. В образцах, облучённых дозами 15–30 кГр, D-антиген не обнаружен (<1 DU/мл). При облучении дозой 5 кГр содержание

Таблица 2. Электрохимические параметры штамма Сэбина вируса полиомиелита типа 1 (штамм LSc 2ab, SI) после инактивации облучением в дозах 5-30 кГр при комнатной температуре

Образец SI/количественные электрохимические параметры	Потенциал окисления, $E_{ок}$ , В	Максимальная амплитуда тока, $I_{ок}$ , мкА	Площадь пика, $S$ , мкА×В
1	0,51±0,01	6,69±0,55	1,460±0,150
2	0,50±0,01	6,74±0,33	1,450±0,083
3	0,50±0,01	10,74±0,26	2,300±0,004
4	0,49±0,01	13,46±0,69	2,790±0,110
5	0,50±0,01	13,29±1,23	2,820±0,230

Примечание: 1,2,3,4,5 – образцы вируса полиомиелита типа 1 (штамм LSc 2ab, SI) в концентрациях  $2 \times 10^7$  частиц на электроде, инаktivированных ионизирующим излучением в дозах (5, 10, 15, 25, 30) кГр, соответственно. Увеличение дозы облучения и изменение конформации белковой оболочки вируса (структурная реорганизация поверхностных белков) сопровождается увеличением сигналов ( $I_{ок}$ ,  $S$ ) электроокисления.

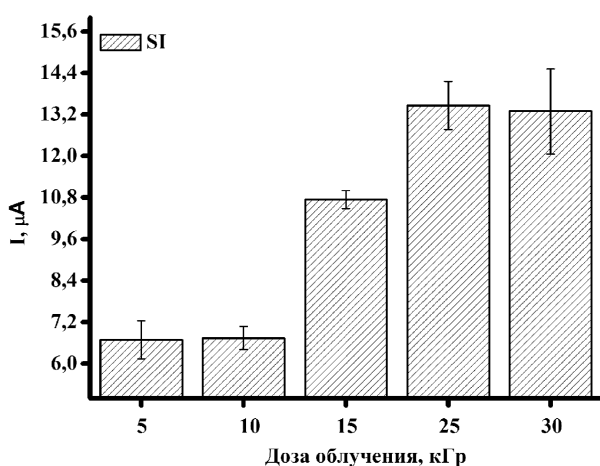


Рисунок 2. Диаграмма максимальных амплитуд токов штамма Сэбина вируса полиомиелита типа 1 (штамм LSc 2ab, SI), инаktivированного облучением при комнатной температуре, в зависимости от дозы облучения 5 кГр, 10 кГр, 15 кГр, 25 кГр, 30 кГр.

D-антигена составило 50 DU/мл, а при облучении дозой 10 кГр содержание D-антигена было 4 DU/мл. Таким образом, потери D-антигена при облучении дозами 5 кГр и 10 кГр без охлаждения составили 93,2% и 99,5%, соответственно.

Известно, что образцы полиовирусов могут содержать не только иммуногенный D-антиген, но и Н(С)-антиген, который не обладает иммуногенными свойствами. Перестройку D-антигена в Н(С)-антиген могут спровоцировать разные факторы (облучение при неоптимальных условиях, нагревание при 56°C, 1 ч) [4].

На основании проведённых экспериментов можно заключить, что условия инаktivации вируса полиомиелита типа 1 (штамм LSc 2ab, SI) ускоренными электронами без охлаждения образцов не являются оптимальными для получения псевдовиральных конструкций, пригодных для создания вакцин, так как происходит разрушение D-антигена.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено сравнительное электрохимическое профилирование вирусных частиц полиомиелита, инаktivированных формальдегидом и различными

дозами облучения ускоренными электронами. На основе полученных данных регистрируемый сигнал идентифицирован как электроокисление именно поверхностных белков капсида в исследованных образцах полиовирусов.

Проанализированы образцы вируса полиомиелита типа 1 (штамм LSc 2ab, SI) при концентрации  $2 \times 10^7$  частиц на электроде, инаktivированные облучением ускоренными электронами в дозах 5 кГр, 10 кГр, 15 кГр, 25 кГр, 30 кГр при комнатной температуре. Увеличение дозы облучения до 15–30 кГр, по-видимому, вызывает изменение конформации белковой оболочки вируса и сопровождается увеличением максимальных амплитуд токов и площадей пиков электроокисления аминокислот, входящих в белки капсида вируса полиомиелита (табл. 2, рис. 2) за счёт их большей доступности к электрохимическим реакциям на электроде. Согласно данным ИФА анализов, в образцах, облучённых дозами 15–30 кГр, D-антиген не обнаружен ( $<1$  DU/мл), что доказывает неэффективность условий инаktivации ускоренными электронами образцов при комнатной температуре с целью получения псевдовиральных частиц, пригодных для создания вакцин.

На основании проведённых экспериментов можно предположить, что инаktivацию ускоренными электронами следует проводить при охлаждении образцов во избежание структурной перестройки D-антигена и сохранения иммуногенности псевдовиральных частиц для получения вакцин.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 23-15-00471, <https://rscf.ru/project/23-15-00471/>

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Chen M., Zhang X.-E. (2021) Construction and applications of SARS-CoV-2 pseudoviruses: A mini review. *Int. J. Biol. Sci.*, **17**(6), 1574–1580. DOI: 10.7150/ijbs.59184
- Geng Q., Tai W., Baxter V.K., Shi J., Wan Y., Zhang X., Montgomery S.A., Taft-Benz S.A., Anderson E.J., Knight A.C., Dinno K.H., Leist S.R., Baric R.S., Shang J., Hong S.-W., Drelich A., Tseng C.-T.K., Jenkins M., Heise M., Du L., Li F. (2021) Novel virus-like nanoparticle vaccine effectively protects animal model from SARS-CoV-2 infection. *PLOS Pathogens*, **17**(9), e1009897. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009897
- Жданов Д.Д., Ивин Ю.Ю., Шишпарёнок А.Н., Краевский С.В., Канащенко С.Л., Агафонова Л.Е., Шумянцева В.В., Гнеденко О.В., Пиняева А.Н., Ковпак А.А., Ишмухаметов А.А., Арчаков А.И. (2023) Перспективы создания вакцинных препаратов нового типа на основе псевдовиральных частиц (на примере вакцины против полиомиелита). *Биомедицинская химия*, **69**(5), 253–280. [Zhdanov D.D., Ivin Yu.Yu., Shishparenok A.N., Kraevskiy S.V., Kanashenko S.L., Agafonova L.E., Shumyantseva V.V., Gnedenko O.V., Pinyayeva A.N., Kovpak A.A., Ishmukhametov A.A., Archakov A.I. (2023) Perspectives for the creation of a new type of vaccine preparations based on pseudovirus particles using polio vaccine as an example. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **69**(5), 253–280.] DOI: 10.18097/PBMC20236905253
- Rezapkin G., Dragunsky E., Chumakov K. (2005) Improved ELISA test for determination of potency of Inactivated Poliovirus Vaccine (IPV). *Biologicals*, **33**(1), 17–27. DOI: 10.1016/j.biologicals.2004.11.003
- Yin H., Kauffman K., Anderson D. (2017) Delivery technologies for genome editing. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **16**, 387–399. DOI: 10.1038/nrd.2016.280
- Кононова А.А. (2020) Псевдовиральная система на основе вируса везикулярного стоматита для поиска противовирусных средств, действующих на вирусные поверхностные белки. Дисс. канд. наук, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск. [Kononova A.A. (2020) Pseudovirusnaya sistema na osnove virusa vezikulyarnogo stomatita dlya poiska protivovirusnykh sredstv, deystvuyushchikh na virusnye poverkhnostnye belki. Diss. kand. nauk, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk.]
- González-Davis O., Villagrana-Escareño M.V., Trujillo M.A., Gama P., Chauhan K., Vazquez-Duhalt R. (2023) Virus-like nanoparticles as enzyme carriers for Enzyme Replacement Therapy (ERT). *Virology*, **580**, 73–87. DOI: 10.1016/j.virol.2023.01.017
- Wilton T., Dunn G., Eastwood D., Minor P.D., Martin J. (2014) Effect of formaldehyde inactivation on poliovirus. *J. Virology*, **88**(20), 11955–11964. DOI: 10.1128/JVI.01809-14
- Fertey J., Thoma M., Beckmann J., Bayer L., Finkensieper J., Reißhauer S., Berneck B.S., Issmail L., Schönfelder J., Casado J.P., Poremba A., Rögnér F.-H., Standfest B., Makert G.R., Walcher L., Kistenmacher A.-K., Fricke S., Grunwald T., Ulbert S. (2020) Automated application of low energy electron irradiation enables inactivation of pathogen- and cell-containing liquids in biomedical research and production facilities. *Sci. Rep.*, **10**(1), 12786. DOI: 10.1038/s41598-020-69347-7
- Jiang S.D., Pye D., Cox J.C. (1986) Inactivation of poliovirus with  $\beta$ -propiolactone. *J. Biol. Stand.*, **14**(2), 103–109. DOI: 10.1016/0092-1157(86)90028-4
- Bagrov D.V., Glukhov G.S., Moiseenko A.V., Karlova M.G., Litvinov D.S., Zaitsev P.A., Kozlovskaya L.I., Shishova A.A., Kovpak A.A., Ivin Y.Y., Pinyayeva A.N., Oksanich A.S., Volok V.P., Osolodkin D.I., Ishmukhametov A.A., Egorov A.M., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P., Sokolova O.S. (2022) Structural characterization of  $\beta$ -propiolactone inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) particles. *Microsc. Res. Tech.*, **85**(2), 562–569. DOI: 10.1002/jemt.23931
- Sobhanie E., Salehnia F., Xu G., Hamidipanih Y., Arshian S., Firoozbakhtian A., Hosseini M., Ganjali M.R., Hanif S. (2022) Recent trends and advancements in electrochemiluminescence biosensors for human virus detection. *TrAC Trends Anal. Chem.*, **157**, 116727. DOI: 10.1016/j.trac.2022.116727
- Ribeiro B.V., Cordeiro T.A.R., Oliveira e Freitas G.R., Ferreira L.F., Franco D.L. (2020) Biosensors for the detection of respiratory viruses: A review. *Talanta Open*, **2**, 100007. DOI: 10.1016/j.talo.2020.100007
- Martins G., Gogola J.L., Budni L.H., Janegitz B.C., Marcolino-Junior L.H., Bergamini M.F. (2021) 3D-printed electrode as a new platform for electrochemical immunosensors for virus detection. *Anal. Chim. Acta*, **1147**, 30–37. DOI: 10.1016/j.aca.2020.12.014
- Pividori M. (2000) Electrochemical genosensor design: Immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods. *Biosens. Bioelectron.*, **15**(5–6), 291–303. DOI: 10.1016/S0956-5663(00)00071-3
- Ciftci S., Cánovas R., Neumann F., Paulraj T., Nilsson M., Crespo G.A., Madaboosi N. (2020) The sweet detection of rolling circle amplification: Glucose-based electrochemical genosensor for the detection of viral nucleic acid. *Biosens. Bioelectron.*, **151**, 112002. DOI: 10.1016/j.bios.2019.112002
- Agafonova L., Zhdanov D., Gladilina Y., Kanashenko S., Shumyantseva V. (2022) A pilot study on an electrochemical approach for assessing transient DNA transfection in eukaryotic cells. *J. Electroanal. Chem.*, **920**, 116635. DOI: 10.1016/j.jelechem.2022.116635
- Agafonova L.E., Zhdanov D.D., Gladilina Y.A., Shishparenok A.N., Shumyantseva V.V. (2024) Electrochemical approach for the analysis of DNA degradation in native DNA and apoptotic cells. *Heliyon*, **10**(3), e25602. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e25602
- Pinyayeva A., Ignatyev G., Kozlovskaya L., Ivin Y., Kovpak A., Ivanov A., Shishova A., Antonova L., Khapchaev Y., Feldblum I., Ivanova O., Siniugina A., Ishmukhametov A. (2021) Immunogenicity and safety of inactivated Sabin-strain polio vaccine “PoliovacSin”: Clinical trials phase I and II. *Vaccines*, **9**(6), 565. DOI: 10.3390/vaccines9060565
- Ковпак А.А., Ивин Ю.Ю., Пиняева А.Н., Хапчаев Ю.Х., Ожерелков С.В., Белякова А.В., Ишмухаметов А.А. (2021) Применение ультрафильтрационных мембран для очистки и концентрирования вируса полиомиелита типа 1 штамм Сэбина. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*, **98**(2), 135–143. [Kovpak A.A., Ivin Y.Y., Pinyayeva A.N., Khapchaev Y.K., Ozharelkov S.V., Belyakova A.V., Ishmukhametov A.A. (2021) Application of ultrafiltration membranes for purification and concentration of Sabin poliovirus type 1. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, **98**(2), 135–143.] DOI: 10.36233/0372-9311-94
- Пиняева А.Н., Ковпак А.А., Ивин Ю.Ю., Санджиева С.Х., Шишова А.А., Целых И.О., Василенко В.Е., Каа К.В., Мажед Ж.Х., Хапчаев Ю.Х., Синогина А.А., Ишмухаметов А.А. (2022) Применение ионообменной

- хроматографии при разработке технологии получения инактивированной вакцины против полиомиелита. Эпидемиология и вакцинопрофилактика, **21**(5), 107–119. [Piniaeva A.N., Kovpak A.A., Ivin Y.Y., Sandzhieva S.H., Shishova A.A., Tselikh I.O., Vasilenko V.E., Kaa K.V., Mazhed Zh.H., Khapchaev Yu.Kh., Siniugina A.A., Ishmukhametov A.A. (2022) Application of ion exchange chromatography in the development of technology to obtain inactivated poliovirus vaccine. Epidemiology and Vaccinal Prevention, **21**(5), 107–119.] DOI: 10.31631/2073-3046-2022-21-5-107-119
22. Пиняева А.Н., Ковпак А.А., Шишова А.А., Сорокин А.А., Простова М.А., Белякова А.В., Синугина А.А., Ишмухаметов А.А., Халчаев Ю.Х., Гмыль А.П. (2021) Подбор сорбента для очистки концентрата вакцинного штамма полиовируса методом гель-фильтрации. Биотехнология, **37**(6), 84–94. [Piniaeva A.N., Kovpak A.A., Ivin Y.Y., Shishova A.A., Sorokin A.A., Prostova M.A., Belyakova A.V., Siniugina A.A., Ishmukhametov A.A., Hapchaev Y.H., Gmyl A.P. (2021) Selection of sorbent for poliovirus vaccine strain concentrate purification by gel filtration. Biotechnologiya, **37**(6), 84–94.] DOI: 10.21519/0234-2758-2021-37-6-84-94
23. Kende M., Robbins M.L. (1965) Titration and neutralization of poliovirus in micro tissue culture under increased carbon dioxide. Appl. Microbiol., **13**(6), 1026–1029. DOI: 10.1128/am.13.6.1026-1029.1965
24. Recommendations for the production and control of poliomyelitis vaccine (inactivated). Retrieved October 12, 2023, from [https://www.who.int/publications/m/item/recommendations-for-the-production-and-control-of-poliomyelitis-vaccine-\(inactivated\)](https://www.who.int/publications/m/item/recommendations-for-the-production-and-control-of-poliomyelitis-vaccine-(inactivated))
25. Brabec V., Mornstein V. (1980) Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes. II. Electrooxidation of amino acids. Biophys. Chem., **12**(2), 159–165. DOI: 10.1016/0301-4622(80)80048-2

Поступила в редакцию: 26. 03. 2024.  
После доработки: 07. 05. 2024.  
Принята к печати: 21. 05. 2024.

## ELECTROCHEMICAL PROFILING OF POLIOVIRUS PARTICLES INACTIVATED BY CHEMICAL METHOD AND IONIZING RADIATION

**L.E. Agafonova<sup>1\*</sup>, V.V. Shumyantseva<sup>1,2</sup>, Yu. Yu. Ivin<sup>1,3</sup>, A.N. Piniaeva<sup>1,3</sup>, A.A. Kovpak<sup>3</sup>,  
A.A. Ishmukhametov<sup>3</sup>, S.V. Budnik<sup>4</sup>, R.S. Churyukin<sup>4</sup>, D.D. Zhdanov<sup>1</sup>, A.I. Archakov<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry,  
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; \*e-mail: agafonovaluba@mail.ru  
<sup>2</sup>Pirogov Russian National Research Medical University,  
Ostrovityanova str. 1, Moscow, 117997 Russia

<sup>3</sup>Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development  
of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences,  
8/1 Moskovsky settlement, Polio Institute settlement, Moscow, 108819 Russia  
4CEO Teocortex LLC, 34/6 Pervomaysky settlement, Moscow, 108808 Russia

Electrochemical profiling of formaldehyde-inactivated poliovirus particles demonstrated a relationship between the D-antigen concentration and the intensity of the maximum amplitude currents of the poliovirus samples. The resultant signal was therefore identified as electrochemical oxidation of the surface proteins of the poliovirus. Using registration of electrooxidation of amino acid residues of the capsid proteins, a comparative electrochemical analysis of poliovirus particles inactivated by electrons accelerated with doses of 5 kGy, 10 kGy, 15 kGy, 25 kGy, 30 kGy at room temperature was carried out. An increase in the radiation dose was accompanied by an increase in electrooxidation signals. A significant increase in the signals of electrooxidation of poliovirus capsid proteins was detected upon irradiation at doses of 15–30 kGy. The data obtained suggest that the change in the profile and increase in the electrooxidation signals of poliovirus capsid proteins are associated with an increase in the degree of structural reorganization of surface proteins and insufficient preservation of the D-antigen under these conditions of poliovirus inactivation.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

**Key words:** electrochemical profiling; poliovirus; pseudovirus, poliomyelitis; inactivation; functional characteristics

**Funding.** This work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 23-15-00471).

Received: 26.03.2024; revised: 07.05.2024; accepted: 21.05.2024.