

УДК 577.3

## АНАЛИЗ РЕЦЕПТОРНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА А МЕТОДОМ ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА

© 2020 г. Г.С. Онхонова, П.Ю. Торжкова, В.Ю. Марченко, С.В. Святченко, А.С. Гудымо, А.Б. Рыжиков

*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово Новосибирской обл.*

*E-mail: onhonova\_gs@vector.nsc.ru*

Поступила в редакцию 29.11.2019 г.

После доработки 29.11.2019 г.

Принята к публикации 28.01.2020 г.

Изучена рецепторная специфичность для штаммов вируса гриппа птиц A/rook/Chany/32/2015 (H5N1), A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) и A/chicken/PrimorskyKrai/03/2018 (H9N2). С помощью метода поверхностного плазмонного резонанса для выбранных штаммов получены значения равновесных констант диссоциации с аналогами рецепторов типа  $\alpha 2$ -3 и  $\alpha 2$ -6. Обнаружено, что для штаммов A/rook/Chany/32/2015 (H5N1) и A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) определяется связь с человеческим типом рецепторов ( $\alpha 2$ -6) в отличие от штамма A/chicken/PrimorskyKrai/03/2018 (H9N2), который специфичен только к птичьему типу рецепторов ( $\alpha 2$ -3).

*Ключевые слова: вирус гриппа, рецепторная специфичность, равновесная константа диссоциации, поверхностный плазмонный резонанс.*

DOI: 10.31857/S0006302920020064

Мониторинг вируса гриппа является частью глобальной системы надзора и имеет важную научно-практическую значимость с точки зрения предупреждения и контроля ежегодных эпидемий, а также повышения готовности к пандемиям. Вирусологические и серологические методы исследования позволяют подтверждать клинические диагнозы, дифференцировать грипп от острых респираторных вирусных инфекций другой этиологии, изучать эволюцию штаммов, а также отслеживать уровень коллективного иммунитета. Оценка рецепторной специфичности на сегодняшний день не входит в перечень обязательных исследований, хотя ее практическая значимость очень высока. Одним из определяющих этапов в процессе жизненного цикла вируса гриппа является рецепторное связывание оболочечного вирусного белка гемагглютинина с сиаловыми кислотами на поверхности клеток-мишеней [1]. Это взаимодействие определяет весь дальнейший ход событий: проникновение в клетку, репликацию, почкование и последующую передачу вируса. Возможность вирусного белка гемагглютинина связываться с рецепторами клеток организма является одним из факторов, определяющим видо-

вую специфичность хозяина по отношению к вирусной инфекции.

Для оценки специфичности связывания вирусного белка гемагглютинина с рецепторами существуют различные стационарные и кинетические методы: иммуноферментный анализ, гликановый скрининг, интерферометрия биослоя, микроскопический термофорез и др. Метод поверхностного плазмонного резонанса также применяется для исследования рецепторной специфичности, но в исследованиях в основном используют гемагглютинин вируса гриппа, полученный генно-инженерным способом. Целью данной работы было получение и изучение специфичности цельновирионных образцов, что является достаточно сложной задачей для исследователя.

### ТЕОРИЯ

Основными белками на поверхности вирионов гриппа являются гемагглютинин и нейраминидаза. Гемагглютинин отвечает за связь с сиаловой кислотой, а также участвует в процессе слияния вирусной и клеточной мембран. Нейра-

минидаза имеет противоположную активность, отщепляя сиаловую кислоту с поверхности мембраны, тем самым не дает заражать уже инфицированную клетку.

Строение человеческих рецепторов отличается от птичьих и для оптимального взаимодействия с клеткой-мишенью необходимо наличие соответствующих белков на поверхности вириона. Гемагглютинин птичьих штаммов распознает сиаловые кислоты, связанные с предпоследней галактозой через связь  $\alpha 2-3$ , а человеческие штаммы преимущественно связываются с  $\alpha 2-6$  сиалозидами [2, 3]. Изменения в рецепторсвязывающих свойствах белков достигаются мутациями в рецепторном сайте связывания. В некоторых случаях подобные мутации приводят к тому, что штамм становится способен пересекать видовой барьер и адаптироваться к другим видам, включая людей. Такие случаи особо важны для мониторинга по причине высокой вероятности возникновения вспышек заболевания.

Принцип поверхностного плазмонного резонанса основан на явлении полного внутреннего отражения, возникающего на границе раздела стеклянной призмы и нанесенной на нее золотой пленки. На поверхности пленки генерируется затухающая волна, которая возбуждает свободные колеблющиеся электроны. При определенном угле падения возникает резонанс, что приводит к снижению интенсивности отраженного света. Резонансный угол является функцией показателя преломления на границе раздела металлической пленки и раствора. Таким образом, сдвиг угла резонанса отражает события на границе раздела, такие как адсорбция белка на поверхности и взаимодействие антиген-антитело. Так как взаимодействие вириона с клеткой-мишенью хорошо описывается кинетикой лиганд-рецепторного взаимодействия [4], метод поверхностного плазмонного резонанса может быть использован для исследования специфичности связывания штаммов вируса гриппа.

## ЭКСПЕРИМЕНТ

Оценку рецепторной специфичности проводили с помощью системы ProteOn XPR36 (BioRad, США). Выбранные штаммы вируса гриппа были наработаны на развивающихся куриных эмбрионах [5]. Далее аллантаоисную жидкость, содержащую вирионы, инактивировали и очищали с помощью комбинации методов фильтрования и хроматографии [6]. Чистота полученных образцов была проверена в ходе электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли. Общую кон-

центрацию белка в конечном продукте измеряли методом Бредфорда. В качестве аналогов рецепторов  $\alpha 2-3$  и  $\alpha 2-6$  использовали сиалозиды 3'-Sialyl-N-acetyllactosamine (3'SLN) и 6'-Sialyl-N-acetyllactosamin (6'SLN) производства Lectinity (Москва), меченные биотином. Для работы использовали чип NLC, покрытый нейтравидином, характеризующимся высокой специфичностью и эффективностью взаимодействия с биотином, которым мечены аналоги рецепторов. Сорбция аналога рецепторов на поверхность чипа проводилась при следующих условиях: раствор сиалозида в фосфатно-солевом буфере с концентрацией 10–200 мкг/мл подавался со скоростью потока 25–30 мкл/мин и временем контакта от двух до шести минут. После достижения необходимого уровня сорбции подавался исследуемый образец: вирус в фосфатно-солевом буфере с концентрациями от 2 до 30 мкг/мл со скоростью потока 80–100 мкл/мин и временем контакта от пяти до шести минут до выхода на насыщение. Далее начинали диссоциацию путем подачи рабочего буфера в течение 10–15 мин. Обработку данных проводили с помощью программного обеспечения ProteOn Manager 3.1.0.

Также было проведено дополнительное исследование выбранных штаммов на основе иммуноферментного анализа с использованием кинетического метода по принципу, описанному ранее [4]. В качестве аналогов рецепторов использовали сиалозиды 3'-Sialyl-N-acetyllactosamine (3'SLN) и 6'-Sialyl-N-acetyllactosamin (6'SLN) производства Dextra (Великобритания), меченные биотином.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе работы на развивающихся куриных эмбрионах были наработаны три образца птичьих штаммов вируса гриппа типа А: A/rook/Chanu/32/2015 (H5N1), A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) и A/chicken/PrimorskyKrai/03/2018 (H9N2). Для выбранных штаммов были получены равновесные константы диссоциации с двумя типами рецепторов –  $\alpha 2-3$  и  $\alpha 2-6$ . Данные представлены в таблице. Для штаммов H5N1 и H5N6 значения, измеренные двумя методами, совпали по порядку. Для штамма H9N2 в случае с рецепторами  $\alpha 2-3$  значения также совпали, в то время как значения для связи с рецепторами  $\alpha 2-6$  сильно разнятся. Значения, полученные методом поверхностного плазмонного резонанса, указывают на очень слабое взаимодействие со штаммом H9N2 либо же на полное отсутствие такового. Результат иммуноферментного анализа, напротив, показал наличие связи. Подобная ситуация может быть объяснена возможным неспецифическим взаимодействием,

Равновесные константы диссоциации для выбранных штаммов вируса гриппа А с аналогами рецепторов  $\alpha 2$ -3 и  $\alpha 2$ -6, полученные методами поверхностного плазмонного резонанса и иммуноферментного анализа

Штамм	Поверхностный плазмонный резонанс		Имуноферментный анализ	
	3'SLN (Lectinity)	6'SLN (Lectinity)	3'SLN (Dextra)	6'SLN (Dextra)
A/rook/Chany/32/2015 (H5N1)	0.20 ± 0.02	6.3 ± 0.2	0.30 ± 0.02	1.7 ± 0.7
A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6)	0.01 ± 0.001	0.040 ± 0.003	0.04 ± 0.02	0.050 ± 0.005
A/chicken/PrimorskyKrai/03/2018 (H9N2)	0.30 ± 0.02	>300	1.6 ± 1.1	17.5 ± 9.6

Примечание. Значения констант диссоциации выражены в мкМ.

свойственным иммуноферментному анализу, или же результатом применения реагентов разных производителей.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы были исследованы следующие штаммы вируса гриппа птиц: A/rook/Chany/32/2015 (H5N1), A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) и A/chicken/PrimorskyKrai/03/2018 (H9N2). С помощью метода поверхностного плазмонного резонанса получены равновесные константы диссоциации с клеточными рецепторами так называемого «птичьего» типа (3'-Sialyl-N-acetylactosamine) и «человеческого» типа (6'-Sialyl-N-acetylactosamine). Для сравнения было проведено дополнительное исследование на основе иммуноферментного анализа. Полученные результаты показали, что несмотря на доминирующую специфичность к рецепторам типа  $\alpha 2$ -3, штаммы A/rook/Chany/32/2015 (H5N1) и A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) специфичны и к рецепторам типа  $\alpha 2$ -6, что указывает на их потенциальную угрозу для человека. Штамм A/chicken/PrimorskyKrai/03/2018 (H9N2) специфичен только к рецепторам типа  $\alpha 2$ -3 по результатам измерения на ProteOn XPR36 и по этой причине не относится к потенциально опасным штаммам вируса гриппа в отношении человека, хотя иммуноферментный анализ определил связь с «человеческим» типом рецепторов. Для уточнения результатов необходимо дальнейшее изучение.

Полученные данные могут быть использованы для анализа общей картины специфичности вируса гриппа птиц по отношению к рецепторам клеток верхнего дыхательного тракта человека и принятия соответствующих мер защиты.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 13/19 «Разработка генетических и фенотипических маркеров для количественной оценки пандемического потенциала зоонозных вирусов гриппа».

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Н. Ильичева, С. В. Нетесов и В. Н. Гуреев, *Вирусы гриппа: методическое пособие* (Новосибирский гос. ун-т, Новосибирск, 2014), ч. 1.
2. A. S. Gambaryan, S. S. Iamnikova, D. K. L'vov, et al., *Mol. Biol.* **36**, 542 (2002).
3. K. Shinya, M. Ebina, S. Yamada, et al., *Nature* **440**, 435 (2006).
4. Г. С. Онхонова, С. В. Мальцев и А. Б. Рыжиков, *Биофизика* **64** (4), 661 (2019).
5. Т. Баррет, П. Берд, Дж. Клегг и др., *Вирусология: методы* (Мир, М., 1988).
6. Р. Скоупс, *Методы очистки белков* (Мир, М., 1985).

## **Analysis of Receptor Specificity of Influenza A Virus Strains by Surface Plasmon Resonance**

**G.S. Onkhonova, P.Yu. Torzhkova, V.Yu. Marchenko, S.V. Svyatchenko,  
A.S. Gudymo, and A.B. Ryzhikov**

*State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia*

The receptor specificity for strains of avian influenza virus A/rook/Chany/32/2015 (H5N1), A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) and A/chicken/PrimorskyKrai/03/2018 (H9N2) was studied. The surface plasmon resonance was used to assess the ability of selected strains to bind to  $\alpha 2-3$  and  $\alpha 2-6$  receptor analogs and the values of the equilibrium dissociation constants were obtained. It has been found that strains A/rook/Chany/32/2015 (H5N1) and A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) display affinity to the human-like receptors ( $\alpha 2-6$ ) while strain A/chicken/PrimorskyKrai/03/2018 (H9N2) has a specific affinity only for the avian-like receptors ( $\alpha 2-3$ ).

*Keywords: influenza virus, receptor specificity, equilibrium dissociation constant, surface plasmon resonance*