

3. Garten R., Blanton L., Elal A.I. et al. Update: influenza activity in the United States during the 2017-18 season and composition of the 2018-19 influenza vaccine. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2018, 67(22): 634-642.
4. Ilyicheva T., Durymanov A., Susloparov I. et al. Fatal cases of seasonal influenza in Russia in 2015-2016. *PLoS One.* 2016, 11(10): e0165332.
5. Ilyicheva T.N., Durymanov A.G., Svyatchenko S.V. et al. Humoral immunity to influenza in an at-risk population and severe influenza cases in Russia in 2016-2017. *Arch.Virol.* 2018. doi: 10.1007/s00705-018-3904-9.
6. Marchenko V.Y., Susloparov I.M., Komissarov A.B. et al. Reintroduction of highly pathogenic avian influenza A/H5N8 virus of clade 2.3.4.4. in Russia. *Arch. Virol.* 2017, 162(5): 1381-1385.
7. World Health Organization FluNet database. URL: [http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/flunet/en/](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/flunet/en/).
8. World Health Organization surveillance network: Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Geneva: WHO Press, 2011.

*Поступила 03.12.18*

Контактная информация: Святченко Светлана Викторовна,  
630559, Кольцово, Новосибирская область, р. т. (383)363-47-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*Н.А.Контаров<sup>1,2</sup>, И.В.Погарская<sup>2</sup>, Н.В.Юминова<sup>2</sup>*

## **ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ, ОБЛАДАЮЩИХ ПРОТИВОВИРУСНЫМ ДЕЙСТВИЕМ, НА АКТИВНОСТЬ НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ГРИППА И ПРОЦЕСС ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ КЛЕТОК ОРГАНИЗМА-ХОЗЯИНА**

<sup>1</sup>Первый московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова, <sup>2</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

*Цель.* Изучение ингибирующего действия полиэлектролитов (ПЭ), обладающих противовирусным действием, в отношении нейраминидазы вируса гриппа. Определение типа и константы ингибирования. Изучение влияние полиэлектролитов на процесс окислительного фосфорилирования в митохондриях клеток организма-хозяина. *Материалы и методы.* В работе использовались очищенные штаммы вируса гриппа: А/ВЧП/Вейбридж (Н<sub>7</sub>Н<sub>7</sub>), А/Маллард Пенсильвания/10218/84 (Н<sub>2</sub>Н<sub>2</sub>), А/NI/BRG-14 (Н<sub>2</sub>Н<sub>1</sub>) с исходным инфекционным титром 4,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. Растворы ПЭ полистиролсульфонат со степенью полимеризации 8 (ПСС-8) в концентрациях 0,5 — 4,0 мМ и полиаллиламин (6 кДа) ПАА (6 кДа) в концентрациях 0,5-4,0 мкМ. Для определения активности нейраминидазы вируса гриппа использовали штаммы вируса гриппа после удаления низкомолекулярных ингибиторов нейраминидазы диализом против бидистиллированной воды. Субстратом нейраминидазы являлся фетуин в конечных концентрациях от 0,052 до 1,2 мкМ для ПАА (6 кДа) и от 0,052 до 1,2 мМ для ПСС-8. В качестве количественных характеристик дыхания и фосфорилирования митохондрий использовали дыхательные коэффициенты по Ларди-Вельману (ДКл) и Чансу-Вильямсу (ДКч), а также отношение АДФ/О. Митохондрии выделяли из скелетных мышц. Определение дыхательных коэффициентов и отношения АДФ/О проводили полярографическим методом. *Результаты.* Выявлен неконкурентный тип ингибирования указанных ПЭ в отношении нейраминидазной активности вирусов гриппа с константами ингибирования  $K_i = 1,6 \pm 0,08$  мкМ для ПАА (6 кДа) и  $K_i = 1,7 \pm 0,085$  мМ для ПСС-8. Определены дыхательные коэффициенты и отношение АДФ/О в отсутствии и после добавления к митохондриям ПСС-8 и ПАА (6 кДа) в концентрациях 20 мМ и 10 мкМ, соответственно. Наблюдалось снижение дыхательных коэффициентов и отношения АДФ/О, что указывало на ингибирование ферментов электрон-транспортной цепи митохондрий. При концентрациях менее 20 мМ и 10 мкМ для ПСС-8 и ПАА (6 кДа) все показатели достоверно не менялись. *Заключение.* Неконкурентный механизм ингибирования нейраминидазной активности вирусов гриппа ПЭ объясняется кон-

формационными изменениями в молекулах фермента и/или фермент-субстратного комплекса и соответственно структурно-функциональными изменениями его вторичной структуры. При выходе за пределы диапазона нетоксических концентраций 20 мкМ для PSS-8 и 10 мМ для PAA (6 кДа) наблюдалось ингибирование ферментов дыхательной цепи митохондрий при сохранении противовирусного эффекта.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 64—68

Ключевые слова: неконкурентное ингибирование, нейраминидаза, вирус гриппа, константы ингибирования, митохондрии, дыхательные коэффициенты

*N.A.Kontarov<sup>1,2</sup>, I.V.Pogarskaya<sup>2</sup>, N.V.Yuminova<sup>2</sup>*

## STUDY OF THE EFFECT OF POLYELECTROLYTES WITH ANTIVIRAL EFFECT ON THE ACTIVITY OF INFLUENZA VIRUS NEURAMINIDASE AND THE PROCESS OF OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IN MITOCHONDRIAS OF CELLS HOST ORGANISM

<sup>1</sup>Sechenov First Moscow State Medical University, <sup>2</sup>Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

*Aim.* Study of the inhibitory effect of polyelectrolytes with antiviral effect against influenza neuraminidase. Determination of the type and inhibition constant. The study of the effect of polyelectrolytes (PE) on the process of oxidative phosphorylation in the mitochondria of cells host organism. *Materials and methods.* Purified influenza virus strains were used: A/VPCH/Weybridge (H<sub>7</sub>N<sub>7</sub>), A/Mallard Pennsylvania/10218/84 (H<sub>5</sub>N<sub>2</sub>), A/NIBRG-14 (H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>) with an initial infectious titer of 4,5 lgTCD<sub>50</sub>/ml. PE solutions of polystyrene-sulfonate with a degree of polymerization of 8 (PSS-8) in concentrations of 0,5—4,0 mM and polyallylamine (6 kDa) PAA (6 kDa) in concentrations of 0,5—4,0 μM. To determine the activity of influenza neuraminidase, influenza virus strains were used after the removal of low molecular weight inhibitors of neuraminidase by dialysis against water. The neuraminidase substrate was fetuin at final concentrations of 0,052 to 1,2 μM for PAA (6 kDa) and from 0,052 to 1,2 mM for PSS-8. As quantitative characteristics of respiration and phosphorylation of mitochondria, respiratory coefficients according to Lardi-Velman and Chans-Williams, as well as the ratio of ADP/O were used. Mitochondria were isolated from skeletal muscle. The determination of respiratory coefficients and the ratio of ADP/O was determined by the polarographic method. *Results.* A noncompetitive type of inhibition of these PEs was detected in relation to the neuraminidase activity of influenza viruses with inhibition constants  $K_i = 1,6 \pm 0,08 \mu\text{M}$  for PAA (6 kDa) and  $K_i = 1,7 \pm 0,085 \text{ mM}$  for PSS-8. Respiratory coefficients and the ratio of ADP / O were determined in the absence and after addition of PSS-8 and PAA (6 kDa) to mitochondria at concentrations of 20 mM and 10 μM, respectively. A decrease in respiratory coefficients and an ADP/O ratio was observed, indicating an inhibition of the enzymes of the electron-transport chain of mitochondria. At concentrations of less than 20 mM and 10 μM for PSS-8 and PAA (6 kDa), all indicators did not significantly change. *Conclusion.* The non-competitive mechanism of inhibition of the neuraminidase activity of the influenza PE viruses is explained by the conformational changes in the molecules of the enzyme and/or enzyme-substrate complex and, accordingly, the structural and functional changes in its secondary structure. When going beyond the range of non-toxic concentrations of 20 mM for PSS-8 and 10 μM for PAA (6 kDa), inhibition of the mitochondrial respiratory chain enzymes was observed while maintaining the antiviral effect.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 4, P. 64—68

Key words: noncompetitive inhibition, neuraminidase, influenza virus, inhibition constants, mitochondria, respiratory coefficients

## ВВЕДЕНИЕ

Эффективность современных вакцин ограничивается постоянно меняющимся антигенным разнообразием вируса гриппа. Поэтому при появлении нового штамма необходимо создание новой вакцины, что экономически невыгодно. В связи с этим, появление нового класса препаратов на основе ПЭ может решить данную проблему

за счет выраженного штамм неспецифического ингибирующего действия в отношении нейраминидазы вируса гриппа. К таким препаратам, обладающих вирусингибирующим действием, можно отнести полиэлектролиты (ПЭ): полистиролсульфонат со степенью полимеризации 8 (ПСС-8) и полиаллиламин с молекулярной массой 6 кДа (ПАА (6 кДа)). Для данных соединений было впервые выявлено повреждающее действие в отношении белков вируса гриппа гемагглютинина и нейраминидазы [1,4]. При этом механизм и кинетические характеристики ингибирования ПЭ нейраминидазы установлены не были. Однако использование данных препаратов может оказывать негативное влияние на клетку, в частности, на процессы окислительного фосфорилирования митохондрий с помощью ингибирования ферментов дыхательной цепи. В данной работе впервые определен неконкурентный тип ингибирования данными соединениями нейраминидазной активности вируса гриппа и рассчитаны константы ингибирования. Определены значения дыхательных коэффициентов и отношения АДФ/О для митохондрий клеток скелетных мышц, в которых может размножаться вирус гриппа.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались очищенные штаммы вируса гриппа: А/ВЧП/Вейбридж (H<sub>7</sub>N<sub>7</sub>), А/Маллард Пенсильвания/10218/84 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>), А/NIВRG-14 (H<sub>3</sub>N<sub>1</sub>) с исходным инфекционным титром 4,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. Растворы ПЭ полистиролсульфонат со степенью полимеризации 8 в концентрациях 0,5 — 4,0 мМ и полиаллиламин (6 кДа) в концентрациях 0,5-4,0 мкМ.

Для определения активности нейраминидазы вируса гриппа использовали штаммы вируса гриппа после удаления низкомолекулярных ингибиторов нейраминидазы диализом против бидистиллированной воды. Субстратом нейраминидазы являлся фетуин («Sigma», США) в конечных концентрациях от 0,052 до 1,2 мкМ для ПАА (6 кДа) и от 0,052 до 1,2 мМ для ПСС-8. Для построения калибровочной кривой готовили ряд пробирок, содержащих от 5 до 40 мкг N-ацетилнейраминовой кислоты в 0,2 мл 0,2 М ФБР, рН = 6,0. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, добавляли 0,1 мл перйодатного реагента, тщательно перемешивали и инкубировали 20 мин при комнатной температуре. К смеси добавляли 1,0 мл арсенитного реагента и перемешивали до тех пор, пока выпавший в осадок йод не растворится вновь. К смеси добавляли 2,5 мл тиобарбитуратного реагента, перемешивали и помещали на 15 мин в кипящую водяную баню. При этом смесь становилась темно-розовой, но при охлаждении бледнела. К смеси добавляли 4 мл бутанолового реагента (N-бутанол, содержащий 5% по объему концентрированной HCl) и интенсивно встряхивали, чтобы экстрагировать окрашенное вещество. Пробирки центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин в настольной центрифуге при комнатной температуре, отбирали водную (нижнюю) фазу и определяли на спектрофотометре Zenhit 200st (РФ) величину поглощения при длине волны 549 нм с соответствующим контролем [5].

Определение типа ингибирования нейраминидазной активности вируса гриппа ПЭ и расчет констант ингибирования проводили методом Диксона [3]. Митохондрии выделяли из скелетных мышц [2]. Значение дыхательного контроля по Ларди-Вильману выражали через отношение (ДКл)=V<sub>3</sub>/V<sub>2</sub> [7]. Данный параметр часто называют коэффициентом усиления, поскольку он характеризует способность митохондрий отвечать на добавку АДФ ускорением своего дыхания и, следовательно, является как бы мерой сродства дыхательной цепи к этому нуклеотиду. Значение дыхательного (акцепторного) контроля по Чансу-Вильямсу выражали через отношение (ДКч)=V<sub>3</sub> /V<sub>4</sub> [6]. Эта величина является показателем интактности структур митохондрий и характеризует ингибирующий эффект наработанного АТФ на перенос электронов по дыхательной цепи: АДФ/О=количество АДФ(нмоль)/ΔО

(потребленному за время фосфорилирования кислорода). Этот показатель, как известно, характеризует энергоэффективность окисления субстратов митохондриями [2]. Все параметры определяли полярографическим методом с помощью электрода Кларка. В качестве субстратов дыхания митохондрий использовали сукцинат калия с конечной концентрацией в ячейке электрода Кларка 3 мМ, АДФ добавляли в конечной концентрации 200 мМ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью определения типа ингибирования нейраминидазной активности ПСС-8 и ПАА (6 кДа) был использован метод Диксона. Исходя из анализа полученных результатов, был сделан вывод о неконкурентном типе ингибирования указанных ПЭ в отношении нейраминидазной активности вирусов гриппа (штамм  $H_5N_2$ ) с константами ингибирования  $K_i = 1,6 \pm 0,08$  мкМ для ПАА (6 кДа) и  $K_i = 1,7 \pm 0,085$  мМ для ПСС-8. В данном случае неконкурентный механизм ингибирования нейраминидазной активности вирусов гриппа ПЭ объясняется конформационными изменениями в молекулах фермента и/или фермент-субстратного комплекса и соответственно структурно-функциональными изменениями его вторичной структуры. Следует отметить, что данный тип ингибирования нейраминидазной активности был характерен для двух использованных в работе штаммов вируса гриппа. Процесс ингибирования в данном случае связан с повреждающим действием ПСС-8 и ПАА (6 кДа) в отношении вторичных структур белковых молекул фермента. Важно отметить, что в случае неконкурентного ингибирования константы ингибирования являются также ингибирующими концентрациями, при которых активность фермента снижается в два раза, т.е.  $IC_{50}$ .

Следующим этапом работы было выяснение возможности ингибирования полиэлектролитами ферментов дыхательной цепи митохондрий клеток, в которых может размножаться вирус гриппа, так как наряду с ингибированием нейраминидазы может наблюдаться концентрационный эффект ингибирования и в отношении ферментов клеток организма хозяина, необходимых для нормального функционирования организма, в частности, осуществления процессов тканевого дыхания. С этой целью были определены основные количественные характеристики процесса окислительного фосфорилирования в митохондриях, выделенных из скелетной мышцы, такие как дыхательные коэффициенты по Ларди-Вельману (ДКл) и Чансу-Вильямсу (ДКч), и показатель сопряжения дыхания и фосфорилирования АДФ/О после взаимодействия с ПСС-8 и ПАА (6 кДа) в концентрациях 20 мМ и 10 мкМ, находящихся на верхнем пределе диапазона нетоксических концентраций, определенным нами ранее [4]. Были получены следующие значения дыхательных коэффициентов и отношения для двух полиэлектролитов АДФ/О (табл. 1,2).

Следует отметить, что при концентрациях ПЭ от 0,5 до 20 мМ для ПСС-8 и от 0,5 до 10 мМ для ПАА (нетоксический диапазон концентраций для обоих ПЭ) снижения показателей окислительного фосфорилирования не происходило.

Регистрируемое снижение показателей, характеризующих сопряже-

Таблица 1. Дыхательные коэффициенты по Ларди-Вельману (ДКл) и Чансу-Вильямсу (ДКч) и показатель сопряжения дыхания и фосфорилирования АДФ/О митохондрий в отсутствии и после взаимодействия с ПСС-8 в концентрации 20 мМ ( $n=19$ ,  $p<0,05$ )

Концентрация, мМ	ДКл	ДКч	АДФ/О
0	$3,02 \pm 0,17$	$3,00 \pm 0,16$	$1,40 \pm 0,10$
20	$2,52 \pm 0,12$	$2,46 \pm 0,14$	$1,09 \pm 0,11$

Таблица 2. Дыхательные коэффициенты по Ларди-Вельману (ДКл) и Чансу-Вильямсу (ДКч) и показатель сопряжения дыхания и фосфорилирования АДФ/О митохондрий в отсутствии и после взаимодействия с ПАА (6 кДа) в концентрации 10 мкМ ( $n=19$ ,  $p<0,05$ )

Концентрация, мкМ	ДКл	ДКч	АДФ/О
0	$3,04 \pm 0,18$	$3,01 \pm 0,16$	$1,52 \pm 0,12$
10	$2,55 \pm 0,12$	$2,44 \pm 0,17$	$1,10 \pm 0,12$

ние процессов дыхания и фосфорилирования, позволяет говорить о наличии серьезных органических нарушений в дыхательной цепи митохондрий. Более выраженное снижение дыхательного коэффициента по Чансу-Вильямсу указывает, что ухудшение тканевого дыхания вызвано нарушением интактности мембран митохондрий, вызванное их взаимодействием с полиэлектролитами. Таким образом, в отношении невирусных ферментов ингибирующие концентрации оказались достоверно выше. Вследствие чего, можно заключить, что диапазон концентраций от 0 до 19 мМ для ПСС-8 и от 0 до 9 мкМ для ПАА (6 кДа) является нетоксическим для организма, как было показано ранее, но с сохранением выраженного противовирусного эффекта, обусловленного ингибированием нейраминидазной активности вируса гриппа.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Артюшенко С.В., Контаров Н.А., Юминова Н.В., Зверев В.В., Контарова Е.О., Балаев Н.В. Влияние полиэлектролитов на инфекционность вируса кори. Журн. микробиол. 2011, 4: 36-40.
2. Барковский Е.В., Бокуть С.Б., Бородинский А.Н. Современные проблемы биохимии. Минск, Вышэйша школа, 2013.
3. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М., МГУ, 1976.
4. Контаров Н.А., Ермакова А.А., Гребенкина Н.С., Юминова Н.В., Зверев В.В. Изучение противовирусной активности полиэлектролитов в отношении вируса гриппа. Вопросы вирусологии. 2015, 60 (4): 5-9.
5. Мейхи Б.В. Дж. Вирусология: Методы. М., Мир, 1988.
6. Chance B., Williams G.R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. Kinetics of oxygen utilization. J. Biol. Chem. 1955, 1 (217): 383-393.
7. Lardy H.A., Wellman H. Oxidative phosphorylations; role of inorganic phosphate and acceptor systems in control of metabolic rates. J. Biol. Chem. 1952, 1(195): 215-224.

Поступила 07.03.19

Контактная информация: Контаров Николай Александрович, к.б.н.,  
119991, Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2, р.т. (499)246-99-01

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*А.О.Смирнова<sup>1,2</sup>, С.А.Барановская<sup>2</sup>, М.М.Токарская<sup>2</sup>, С.И.Елкина<sup>2</sup>, Н.Е.Ястребова<sup>2</sup>*

## **МОДЕЛИ ЗАВИСИМОСТИ КОЛИЧЕСТВА БИОМАССЫ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE И ЕГО КАПСУЛЬНОГО ПОЛИСАХАРИДА ОТ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ**

<sup>1</sup>Российский химико-технологический университет им. Д.И.Менделеева, <sup>2</sup>НИИ вакцин и сывороток им.И.И.Мечникова, Москва

*Цель.* Разработка полусинтетической питательной среды, обеспечивающей получение максимального количества капсульного полисахарида (КПС). *Материалы и методы.* В работе использовали штамм 521 S. pneumoniae серотипа 23F. Культивирование проводили в пробирках с 10 мл полусинтетической питательной среды определенного состава. Количество полисахарида в пробах определялось с помощью ракетного иммуноэлектрофореза. Построение моделей и сравнение влияния различных компонентов осуществлялось согласно методике, указанной в учебном пособии. Расчет коэффициентов уравнения и оценка адекватности самих уравнений проводился с применением пакетов RStudio версии 1.0.153. *Результаты.* В результате серии экспериментов были вычислены коэффициенты уравнений регрессии, оценена их значимость и построены модели зависимости продукции биомассы и КПС в зависимости от состава питательной среды. Для решения поставленной задачи был проведен эксперимент согласно методу Бокса-Уилсона. В качестве оптимизируемых параметров были выбраны концентрации пептона и глюкозы.