



Использование синхротронного излучения в вирусологии

А.М. Кондранова^{1,2}, А.А. Гладышева^{1,2}, А.В. Гладышева¹, А.П. Агафонов¹

¹ ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора», р.п. Кольцово, Новосибирская обл., 630559, Российская Федерация

² ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», ул. Пирогова, д. 1, г. Новосибирск, 630090, Российская Федерация

Резюме

Введение. Востребованность новых быстрых научных методов по созданию лекарственных препаратов для общественного здравоохранения становится все более острой. Для эффективной разработки вакцин и противовирусных препаратов важно детальное знание пространственной структуры вирусных белков и их комплексов, формирующихся при инфицировании организма вирусами, а для качественного проведения испытаний биопрепаратов важен своевременный подбор чувствительных животных моделей и изучение патогенеза инфекционного заболевания на них, в таком случае на помощь приходит новый мощный инструмент – источник синхротронного излучения.

Цель: анализ возможностей существующих источников синхротронного излучения для проведения вирусологических исследований от макроорганизмов до отдельных вирусных белков.

Материалы и методы. Проведен поиск литературы за период 1996–2022 гг. о применении синхротронного излучения в вирусологии и его значимости для общественного здравоохранения в будущем с использованием соответствующих ключевых слов в поисковой системе PubMed и базе данных PDB. Итоговая выборка состоит из 51 полнотекстового материала.

Результаты. В настоящее время в мире насчитывается более 70 различных источников синхротронного излучения, многие из них применяются для разносторонних биологических исследований живых систем. Фазово-контрастная рентгенография дает возможность визуализации мягких тканей *in vivo* с разрешением до 1 мкм без использования контрастных веществ. При помощи синхротронного излучения становится возможной 3D-гистология в реальном времени без необходимости подготовки ультратонких срезов. Получение структуры вирусных белков в растворе и белковая кристаллография, реализуемая при источниках синхротронного излучения, активно используется в разработке противовирусных препаратов и изучении фундаментальных свойств вирусов начиная с 2000 года.

Заключение. Рентгеновские методы, реализованные на источниках синхротронного излучения и обсуждаемые в этом обзоре, составляют фундаментальную основу многих вирусологических исследований и имеют перспективное будущее для обеспечения биологической безопасности России.

Ключевые слова: синхротронное излучение, вирусология, микротомография животных, гистология, белковая кристаллография.

Для цитирования: Кондранова А.М., Гладышева А.А., Гладышева А.В., Агафонов А.П. Использование синхротронного излучения в вирусологии // Здоровье населения и среда обитания. 2022. Т. 30. № 12. С. 81–88. doi: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2022-30-12-81-88>

Сведения об авторах:

Кондранова Анастасия Михайловна – стажер-исследователь ФБУН «ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора», аспирант Новосибирского государственного университета; e-mail: kondranova_am@vector.nsc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7416-5797>.

Гладышева Анастасия Андреевна – стажер исследователь ФБУН «ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора», магистрант Новосибирского государственного университета; e-mail: gladysheva_aa@vector.nsc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9490-1939>

✉ **Гладышева** Анастасия Витальевна – младший научный сотрудник, аспирант, заместитель руководителя проекта «Использование синхротронного излучения для вирусологических исследований» ФБУН «ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора»; e-mail: gladysheva_av@vector.nsc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7396-3954>.

Агафонов Александр Петрович – д.б.н., заместитель генерального директора по научной работе, руководитель проекта «Использование синхротронного излучения для вирусологических исследований» ФБУН «ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора»; e-mail: agafonov_ap@vector.nsc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2577-0434>.

Информация о вкладе авторов: концепция и дизайн исследования: Гладышева А.В.; сбор и обработка материала: Кондранова А.М., Гладышева А.А.; анализ и интерпретация результатов: Гладышева А.В.; обзор литературы: Кондранова А.М., Гладышева А.А.; подготовка проекта рукописи: Гладышева А.В., Агафонов А.П. Все авторы ознакомились с результатами работы и одобрили окончательный вариант рукописи.

Соблюдение этических стандартов: данное исследование не требует представления заключения комитета по биомедицинской этике или иных документов.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение от 12.10.2021 № 075-15-2021-1355), в рамках реализации отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры на 2019–2027 годы.

Конфликт интересов: авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Статья получена: 16.11.22 / Принята к публикации: 05.12.22 / Опубликовано: 20.12.22

The Use of Synchrotron Radiation in Virology

Anastasiya M. Kondranova,^{1,2} Anastasia A. Gladysheva,^{1,2} Anastasia V. Gladysheva,¹
Alexander P. Agafonov¹

¹ State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”,
Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation

² Novosibirsk State University, 1 Pirogov Street, Novosibirsk, 630090, Russian Federation

Summary

Introduction: The demand for new rapid methods for development of medicines for health care is becoming more relevant. Detailed knowledge of the spatial structure of viral proteins and their complexes formed when the organism is infected with viruses is important for effective development of vaccines and antiviral drugs. Timely selection of sensitive animal models and the study of the pathogenesis of an infectious disease on them are important for quality testing of biological preparations. The synchrotron radiation source is a new powerful biological research tool.

Objective: To analyze the potential of existing sources of synchrotron radiation for conducting virology research, from macroorganisms to individual viral proteins.

Materials and methods: We searched for literary sources published in 1996–2022 and devoted to the use of synchrotron radiation in virology and its importance for public health in the future using relevant keywords in the PubMed and PDB databases. Fifty-one full-text publications were found eligible for inclusion in the review.

Results: Currently, there are over 70 different synchrotron radiation sources worldwide and many of them are used for diverse biological studies of living systems. Phase-contrast X-ray imaging makes it possible to visualize soft tissues *in vivo* with resolution up to 1 μm in the absence of contrast agents. Synchrotron radiation allows real-time 3D-histology without the necessity to prepare ultra-thin slices. Obtaining the structure of viral proteins in solution and protein crystallography realized with synchrotron radiation sources has been actively used in antiviral drug development and the study of fundamental properties of viruses since 2000.

Conclusion: The X-ray techniques realized in synchrotron radiation sources discussed in this review constitute the fundamental basis of many virology studies and have a promising future for ensuring biological safety of Russia.

Keywords: synchrotron radiation, virology, animal microtomography, histology, protein crystallography.

For citation: Kondratova AM, Gladysheva AA, Gladysheva AV, Agafonov AP. The use of synchrotron radiation in virology. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya*. 2022;30(12):81–88. (In Russ.) doi: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2022-30-12-81-88>

Author information:

Anastasiya M. **Kondranova**, Trainee Researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”; postgraduate student, Novosibirsk State University; e-mail: kondranova_am@vector.nsc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7416-5797>.

Anastasiya A. **Gladysheva**, Trainee Researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”; graduate student, Novosibirsk State University; e-mail: gladysheva_aa@vector.nsc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9490-1939>

✉ Anastasiya V. **Gladysheva**, Junior Researcher, postgraduate student, Deputy Head of the Project “The use of synchrotron radiation for virology research”, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”; e-mail: gladysheva_av@vector.nsc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7396-3954>.

Alexander P. **Agafonov**, Dr. Sci. (Biol.), Deputy Director-General for Research, Head of the Project “The use of synchrotron radiation for virology research”, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”; e-mail: agafonov_ap@vector.nsc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2577-0434>.

Author contributions: study conception and design: Gladysheva A.V.; collection and processing of the material: Kondranova A.M., Gladysheva A.A.; analysis and interpretation of the results: Gladysheva A.V.; literature review: Kondranova A.M., Gladysheva A.A.; draft manuscript preparation: Gladysheva A.V., Agafonov A.P. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

Compliance with ethical standards: Ethics approval was not required for this study.

Funding: The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2021-1355 dated October 12, 2021) as part of implementation of certain activities of the Federal Scientific and Technical Program for the Development of Synchrotron and Neutron Research and Research Infrastructure for 2019–2027.

Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

Received: November 16, 2022 / Accepted: December 5, 2022 / Published: December 20, 2022

Введение. Государственное управление системой здравоохранения и обеспечения здоровья населения является важным, краеугольным элементом общественного здравоохранения. Несмотря на то что на первое место по экономическому и социальному ущербу в мире и в Российской Федерации вышли заболевания сердечно-сосудистой системы, инфекционные заболевания продолжают быть серьезной проблемой для здравоохранения многих стран мира. Кроме этого, Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) отмечает тревожную тенденцию к общему замедлению темпов борьбы с инфекционными заболеваниями [1].

Одним из наиболее эффективных средств борьбы с инфекционными заболеваниями остается вакцинация. По данным ВОЗ плановая вакцинация ежегодно спасает жизнь и здоровье 3 миллионам детей в мире. С помощью новых вакцин, которые будут разработаны в ближайшие 5–10 лет, можно будет предотвратить гибель еще 8 миллионов детей в год [2, 3]. По данным исследований вакцинация предупредила как минимум 14,4 миллиона (95 % доверительный интервал [CI] 13,7–15,9) смертей от COVID-19 в 185 странах и территориях только в период с 8 декабря 2020 года по 8 декабря 2021 года [4].

Новые и вновь возникающие инфекционные вирусные заболевания угрожали человечеству на протяжении всей истории, например натуральная оспа долгое время занимала одно из первых мест среди инфекционных заболеваний из-за высокой смертности и инвалидизации переболевших, или же новая коронавирусная инфекция COVID-19, которая с 2020 по 2022 г. уже унесла жизни более 6,5 миллиона человек. Несколько взаимосвязанных и синергетических факторов, включая демографические тенденции и урбанизацию с высокой плотностью населения; модернизацию, способствующую высокой мобильности людей, использующих скоростные виды транспорта; увеличивающиеся возможности организации мероприятий с большим скоплением людей; изменения окружающей среды с модификацией экосистем, — все это ускоряет появление и распространение

опасных для человека патогенов в современном мире. Анализ последних эпидемий (пандемический грипп 2009 г., лихорадка Эбола 2014–2016 гг., COVID-19) показывает, что наибольшую опасность представляют вирусы с пандемическим потенциалом. Для ускоренной разработки противовирусных лекарственных препаратов и повышения их эффективности важно получить детальные знания о пространственной структуре вирусных белков и их комплексов, формирующихся при инфицировании организма человека вирусами, а для качественного проведения клинических и доклинических испытаний биопрепаратов важен своевременный подбор чувствительных животных моделей и изучение патогенеза инфекционного заболевания на них. Все эти исследования могут быть проведены с использованием нового мощного исследовательского инструмента — источника синхротронного излучения (ИСИ).

Биологические исследования с использованием ИСИ напрямую и/или косвенно через получение фундаментальных знаний стимулируют поиск новых и усовершенствованных методов профилактики и лечения, которые преодолеют некоторые ограничения современных лекарств против различных инфекционных вирусных заболеваний. Строительство дополнительных ИСИ в Российской Федерации, таких как Сибирский кольцевой источник фотонов (СКИФ) поколения 4+ в Кольцово Новосибирской области, рядом с Государственным научным центром вирусологии и биотехнологии «Вектор», значительно повысит доступность таких исследований для ученых в области вирусологии и молекулярной биологии и укрепит реализацию столь важной для Российской Федерации миссии по обеспечению национальной биологической безопасности, краеугольным камнем которой является быстрое реагирование на вновь возникающие вирусные угрозы.

В настоящее время в мире насчитывается более 70 различных ИСИ, многие из них применяются для разносторонних исследований живых систем, однако результатов исследований, проводимых с вирусами, получено крайне мало. Это может

быть объяснено тем, что выполнение таких работ зачастую требует определенного уровня биологической защиты лаборатории ИСИ, в котором проводятся исследования. На данный момент в мире не существует ни единой лаборатории при ИСИ с уровнем защиты BSL3/BSL4, позволяющим проводить исследования с особо опасными вирусами, такими как вирус натуральной оспы, эболавирусы, высокопатогенные для человека варианты вируса гриппа (H5, H7, H9), корона-вирус SARS-CoV-2, вирус клещевого энцефалита и другие. В скором времени в России будет построен СКИФ, на котором будет реализована станция с уровнем биозащиты BSL3, поэтому непосредственной целью данного обзора являлось рассмотрение возможностей существующих ИСИ для проведения вирусологических исследований и применение ИСИ для создания и повышения эффективности противовирусных лекарственных препаратов.

Материалы и методы. Был проведен поиск литературы об использовании синхротронного излучения в вирусологии и его значимости для общественного здравоохранения в будущем с использованием ключевых слов «синхротронное излучение, вирусология, микротомография животных, гистология, белковая кристаллография» в поисковой системе PubMed, по базам данных Scopus, Web of Science и базе данных белковых последовательностей PDB за период с 1996 по 2022 г. Однако данный обзор охватывает более широкий исторический период времени, начиная с упоминания о получении пространственной структуры миоглобина кашалота 1958 г. [5], которое послужило основой для начала рентгеноструктурных исследований белков. Критерий отбора: статьи, посвященные использованию рентгеновских методов, реализованных на источниках синхротронного излучения, в вирусологии, биологии и белковой кристаллизации. Итоговая выборка после углубленного анализа первоначально отобранных источников литературы состоит из 51 полнотекстового материала и официально взятой информации из Всемирной организации здравоохранения и ESRFnews — European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), которые удовлетворяют вышеуказанному критерию.

Результаты

1. Поколения источников синхротронного излучения

На сегодня существует четыре поколения ИСИ. Первое поколение — синхротроны, построенные для экспериментов по физике высоких энергий, где синхротронное излучение было побочным явлением. На этих установках впервые начали отрабатываться методики применения синхротронного излучения в научных исследованиях. Второе поколение — синхротроны, специально построенные для генерации синхротронного излучения при помощи поворотных магнитов. Первым таким ИСИ стал Tantalus, запущенный в 1968 г. в США. Третье поколение — это ИСИ сегодняшнего дня, где устройствами для генерации когерентного синхротронного излучения являются специальные устройства — вигглеры и ондуляторы. Условно ИСИ третьего поколения можно разделить на три группы. Первая группа — это синхротроны с малой энергией до 3 ГэВ: BESSY II в Германии с энергией до 1,7 ГэВ

[4], SOLEIL во Франции с энергией 2,75 ГэВ [6] и компактный источник света MuCLS в Германии с энергией от 15 кэВ до 35 кэВ [7]. Примерами второй группы синхротронов с энергией 3 ГэВ являются ASP в Австралии [8], ALBA в Испании [9] и Diamond Light Source в Великобритании [10]. И третья группа синхротронов — это расположенные в Японии SPring-8 с самой высокой в мире энергией 8 ГэВ [11] и расположенный в США APS с энергией 7 ГэВ [12].

Совсем недавно во Франции появился самый высокоэнергичный в Европе ИСИ четвертого поколения ESRF с энергией 6 ГэВ [13]. Рентгеновские лазеры на свободных электронах (XFEL, Германия) обещают открыть новые возможности в биологических исследованиях. Они производят рентгеновские лучи с исключительными свойствами: их пиковая яркость на 9–10 порядков выше, а длительность импульса в 1000 раз меньше, чем у существующих в мире линий синхротронного излучения. Дифракционные картины могут быть зарегистрированы от микро- и нанокристаллов еще до того, как радиационное повреждение начнет разрушать образцы. Используя эту концепцию «дифрагировать перед разрушением», возникла новая область биологии XFEL, в которой, как предполагается, будут решаться биологически важные вопросы, выходящие за рамки того, что возможно с использованием традиционных ИСИ [14–16]. Вместе взятые, ИСИ и XFEL представляют собой мощный набор инструментов, которые позволят проводить передовые структурно-биологические исследования сложных молекул и молекулярных механизмов.

В настоящее время в мире насчитывается более 70 различных ИСИ, многие из которых полностью или в значительной степени предназначены для генерации синхротронного излучения для использования в таких областях, как материаловедение, исследования полупроводников, геология, неорганическая кристаллография, кристаллография малых молекул и, все чаще, структурная биология и микротомография живых объектов. В России на сегодня действуют два источника СИ — в НИЦ «Курчатовский институт» в Москве («КИСИ-Курчатов») и в Институте ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН в Новосибирске (Сибирский центр синхротронного и терагерцевого излучения — ускорители ВЭПП-3, ВЭПП-4).

2. Использование ИСИ в биологии

Развитие структурной биологии и возможность экспериментального решения пространственного строения белков стало настоящим прорывом для вирусологии и медицины в целом. Понимание того, как расположены атомы в молекуле белка и какие взаимодействия их объединяют, дает возможность целевым образом работать со структурой белка и, следовательно, менять его функции. Это позволило ученым всего мира отойти от метода почти «слепого» перебора при создании лекарственных и противовирусных препаратов и перейти к их рациональному дизайну, основываясь на определении конкретной лекарственной мишени, воздействие на которую будет оказывать терапевтический эффект (технология Drug-Design). Начало экспериментальному получению трехмерной структуры белков было положено еще в 1958 г., когда впервые была определена пространственная структура миоглобина кашалота [5]. Первым препаратом, созданным с помощью дизайна пространствен-

ной структуры, стал дорзоламид, являющийся ингибитором карбоангидразы [17]. Недавно данный препарат стали также рассматривать как новый агент против устойчивых к ванкомицину энтерококков, являющихся основной причиной инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи и представляющих серьезную угрозу для общественного здравоохранения [18]. На сегодня с помощью методов экспериментального получения пространственных структур белков, в том числе и рентгеновской кристаллографии, ставшей основным инструментом структурной биологии, были собраны целые базы данных, содержащие уже решенные трехмерные белковые структуры и позволяющие ученым проводить теоретический поиск лекарственных мишеней. Одной из таких баз является Protein Data Bank (PDB) [19]. Тем не менее стоит понимать, что для получения достоверных знаний о взаимодействии лекарства с патогеном и их воздействии на организм одних теоретических расчетов недостаточно. Необходимо проведение множества экспериментов. Сверхяркие источники рентгеновского излучения, такие как будущий СКИФ со значением эмиттанса $0,075 \text{ нм} \cdot \text{рад}$, позволяют с высокой скоростью просвечивать исследуемые объекты, и таким образом у ученых появится возможность в режиме реального времени следить за столь быстропротекающими процессами, как взаимодействие вируса с противовирусным препаратом, ингибирующим его репликацию в организме человека, а также в динамике детально изучать течение вирусных инфекций на модельных животных [20].

2.1. Рентгеновская томография животных

Рентгеновское изображение широко используется для неинвазивного выявления внутренних структур тела и может обеспечить лучшее пространственное разрешение, чем другие неинвазивные методы. Благодаря этим возможностям рентгеновское изображение стало важным диагностическим инструментом в медицинских клиниках, но области его использования продолжают расширяться [21].

Фазово-контрастная рентгенография (PCXI) — это новый метод визуализации, который может

значительно улучшить рентгенографию для медицинской визуализации. РСХИ позволяет анализировать структуры мягких тканей, визуализируя фазовые градиенты в рентгеновском волновом поле, такие изображения невозможно получить с помощью обычной компьютерной томографии (КТ) [22–26]. Метод значительно улучшает контрастное разрешение структур мягких тканей, что принципиально важно, когда речь идет об изучении инфекционного процесса на модельных лабораторных животных, а также при проведении доклинических исследований противовирусных препаратов и вакцин.

РСХИ дает возможность визуализации мягких тканей без необходимости использования контрастных веществ или в дозе примерно в 400 раз ниже, чем требуется для стандартной КТ, при этом максимально достижимое разрешение на сегодня составляет $\sim 1 \text{ мкм}$. Исследования, проведенные на модели восьминедельных самок мышей C57BL/6N, показали, что поток и когерентность квазимонохроматического рентгеновского луча, обеспечиваемого ИСИ, позволяют получать фазово-контрастные изображения, просто увеличивая расстояние от образца до детектора [27]. Другие исследования продемонстрировали, что РСХИ является эффективным инструментом изучения мозга мелких животных, обеспечивая получение изображений структур тканей с высоким разрешением и четким разграничением серого и белого вещества [28–31]. Croton L. и соавт. с помощью линии луча с поворотным магнитом BL20B на SPring-8 (Хёго, Япония) получили первую *in situ* визуализацию мозга крышонка в 30-дневном гестационном возрасте [32]. На этой же установке BL20B SPring-8 другой группой авторов были отработаны методики исследования противораковых препаратов на лабораторных животных с привитыми опухолями *in vivo* (рис. 1А) [33]. На линии луча BL13W Шанхайского центра синхротронного излучения (SSRF, Шанхай, КНР) были отработаны методики исследования сосудистых заболеваний человека на мышинной модели *in vivo* (рис. 1В) [34].

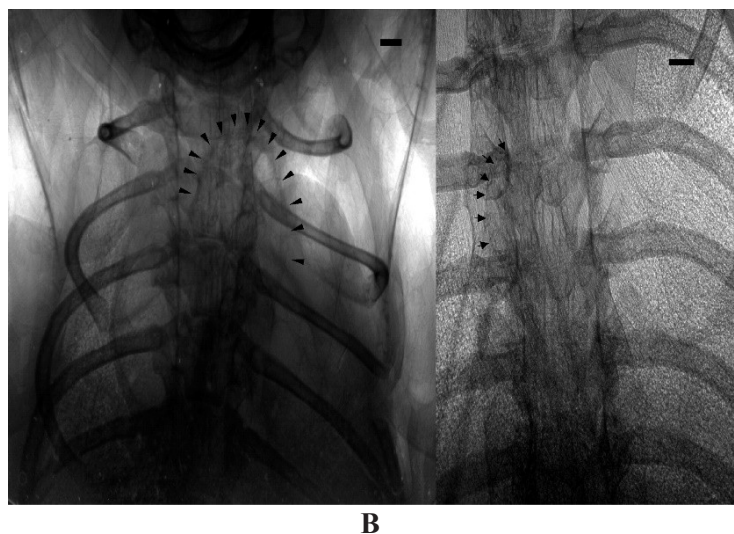
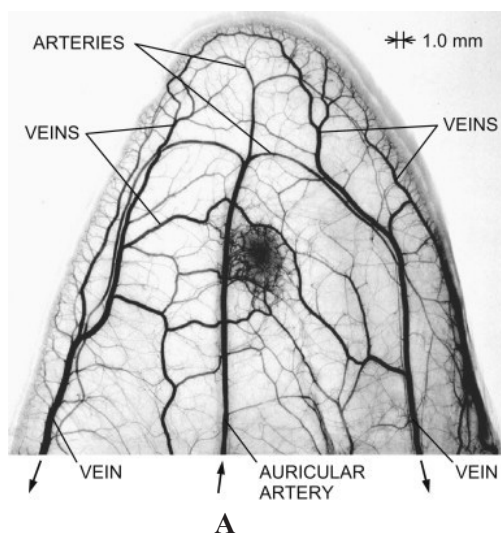


Рис. 1. Рентгенограмма лабораторных животных, сделанная на источнике синхротронного излучения *in vivo*:

(А) — ушная раковина кролика с имплантированной опухолью — карцинома VX2 [33];

(В) — грудная аорта 62-недельных (слева) и 24-недельных (справа) мышей [34]

Fig. 1. The X-ray image of laboratory animals taken on a synchrotron radiation source *in vivo*. (A) Rabbit pinna with implanted VX2 carcinoma tumor [33]. (B) Thoracic aorta of 62-week-old (left) and 24-week-old (right) mice [34]

Синхротронные исследования лабораторных животных, которые описаны выше, играют ключевую роль в разработке новых вакцин и противовирусных препаратов. Прежде чем перспективные вакцины-кандидаты можно будет испытывать на людях, их сначала необходимо проверить на безопасность и эффективность на животных. При этом важно, что исследования при помощи ИСИ дают более четкую картину происходящих при введении препарата процессов и возможность зафиксировать любые патологические изменения в организме животного как в результате поражения вирусом, так и при негативном воздействии самого испытываемого препарата.

2.2. Трехмерная рентгеновская гистология (3D-гистология)

Биологические ткани имеют сложную структуру на каждом (от органного до субклеточного) уровне организации [34]. Изучение архитектуры тканей и клеточной морфологии играет важную роль в биологических и медицинских исследованиях. Трехмерная визуализация тканей (3D-гистология) при классических гистологических методах ранее была затруднена и требовала серийных ультратонких срезов тканей, анализ которых отнимал много времени и сил исследователя (рис. 2). Однако благодаря прогрессу в рентгеновской микроскопии получение объемной визуализации тканей стало возможным. Построение модели на микротомографическом изображении с разрешением от клеточного до субклеточного может выявить структурную основу биологической функции, заложенную в трехмерном изображении [35].

С быстрым развитием синхротронного излучения и детекторов рентгеновского излучения синхротронная рентгеновская фазово-контрастная томография (SR-XPCT) была успешно использована для изучения онкологических и других заболеваний. SR-XPCT позволяет визуализировать даже самые незначительные изменения в морфологии и плотности мягких тканей, после чего микроциркуляторные и нейронные сети могут быть успешно реконструированы с помощью методов обработки снимков без подготовки срезов и окрашивания образцов ткани [36, 37]. С использованием метода синхротронной рентгеновской фазово-контрастной томографии на ИСИ EBS ESRF (Гренобль, Франция) было получено первое трехмерное изображение ткани легкого мужчины, пострадавшего от COVID-19, с разрешением 2 мкм, что примерно в 100 раз лучше, чем разрешение клинических изображений компьютерной томографии¹.

Картирование больших нейронных сетей мозга животных и человека является фундаментальной, но до сих пор труднодостижимой задачей из-за огромного количества данных и, как следствие, непомерно длительного времени получения и обработки изображений. Для решения этой проблемы была разработана эффективная стратегия под названием «AXON» (ускоренное рентгеновское наблюдение нейронов), которая успешно реализована параллельно на всех установках синхротронного излучения Национального исследовательского центра синхротронного излучения NSRRC, включая Тайваньский источник света (TLS), Тайваньский источник фотонов (TPS),

SPRING-8 в Японии, Сингапурский источник синхротронного света (SSLS) и источник света PLS-II в Корее. Возможности AXON, в частности, позволили за несколько дней выполнить полное 3D-картирование мозга дрозофилы, однако эта стратегия может обеспечить полное картирование головного мозга в реалистичной временной шкале даже крупных животных и человека [38].

На ИСИ BESSY II в Германии были получены нанотомографические изображения культуры клеток PtK2, инфицированной вирусом оспы коров (BOK). На рис. 3 показаны клетки PtK2, инфицированные штаммом BOK, экспрессирующим зеленый флуоресцентный белок, вместе со структурами, появившимися в результате деятельности вируса: вирусными фабриками и двумя типами вирусных частиц, относящихся к разным ступеням созревания BOK (незрелые и зрелые частицы) [39].

Все эти примеры показывают, что ИСИ поколения 3, 4 и более, например такие, как SKIF, дают возможность получать качественные объемные изображения тканей организма в реальном времени с высоким разрешением, оставляя далеко позади трудоемкую технологию выявления патологических изменений при изучении ультратонких гистологических срезов.

2.3. Структура вирусных белков

Все структурные исследования вирусных белков делятся на два больших кластера методов в зависимости от того, кристаллизуется белок или нет. В данном разделе мы рассмотрим только методы, использующие рентгеновские лучи.

Первый метод — это классическая рентгеновская кристаллография, появление которой в свое время сделало прорыв в изучении трехмерных структур макромолекул. Примерно с начала 2000-х гг. вирусные белки начали активно исследовать с помощью синхротронного излучения. Так, в 2000 г. на линии BM14 Европейского источника синхротронного излучения (ESRF, Гренобль, Франция) была получена структура матричного белка VP40 вируса Эбола [40]. Позднее, в 2007 г., на модернизированной линии BM14CRG ESRF была

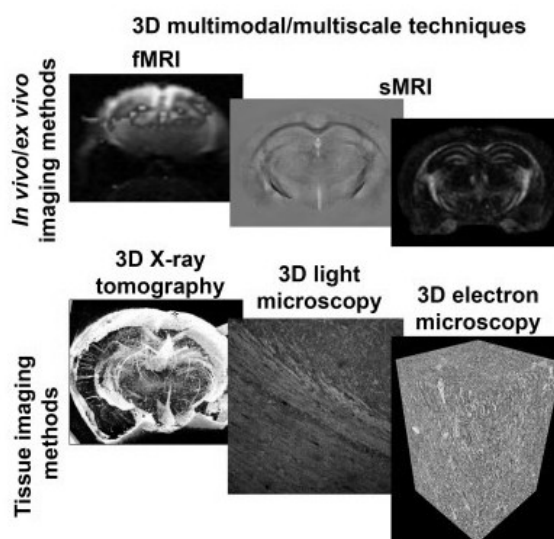


Рис. 2. Сравнение методов 3D-гистологии

Fig. 2. Comparison of 3D histology methods

¹ The finest image. [Электронный ресурс] Режим доступа: https://www.esrf.fr/Apache_files/Newsletter/2021/March/1-ESRF-News-March-2021.html#/page/14 (дата обращения: 12.03.2021).

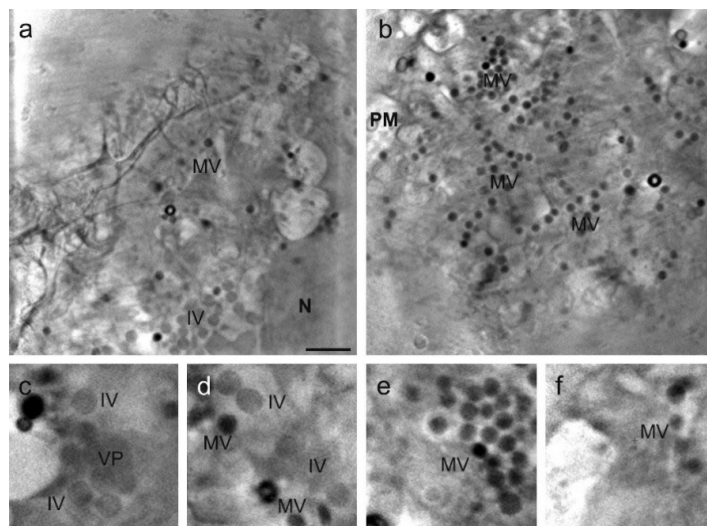


Рис. 3. Выявление различных вирусных форм ВОК в клетках PtK2 методом криорентгеновской нанотомографии [39]: (a) — базальная томографическая плоскость реконструированной клетки с помощью криорентгеновской нанотомографии; N обозначает положение ядра, IV и MV — относительное положение различных незрелых и зрелых вирусных частиц соответственно; (b) — верхняя томографическая плоскость той же реконструкции, что и на (a); PM отмечает положение плазматической мембраны клетки, а MV указывает на зрелые вирусные частицы; (c) — образование незрелых вирионов (IV) из вироплазмы и полулуний (VP); (d) — область цитоплазмы, показывающая незрелые частицы (IV), близкие к зрелым вирионам (MV); (e) — группа плотноупакованных зрелых частиц (MV); (f) — зрелые частицы вблизи плазматической мембраны клетки

Fig. 3. Detection of different VACV viral forms in infected PtK2 cells by cryo X-ray nano-tomography [39]. Panel (a): Basal tomographic plane of a reconstructed cell by cryo X-ray nano-tomography. N marks the position of the nucleus, IV and MV — the relative positions of the different immature and mature viral particles, respectively. Scale bar represents 1 micron. (b) Upper tomographic plane of the same reconstruction as in (a). PM marks the position of the plasma membrane of the cell and MV points to the mature viral particles. The scale is the same as in (a). (c) Formation of immature virions (IV) from viroplasm and crescents (VP). Scale bar represents 0.5 microns. (d) Area of the cytoplasm showing immature particles (IV) close to mature virions (MV). (e) A group of densely packaged mature particles (MV). (f) Mature particles near the plasma membrane (PM) of the cell

получена кристаллическая структура С-концевого димерного домена белка VP30 вируса Эбола, который взаимодействует с вирусным нуклеокапсидом и активирует синтез вирусной мРНК в инфицированной клетке [41]. В 2017 г. на линии 12-2 Стэнфордского синхротронного источника света (SSRL, Калифорния, США) была решена пространственная структура домена олигомеризации белка VP35 вируса Марбург [42], а на линии BL17U Шанхайского центра синхротронного излучения (SSRF, Шанхай, Китайская Народная Республика) — нуклеопротеина вируса Марбург [43]. Филовирусы (марбургвирус и эболавирусы Заир, Судан, Бундибужо и Тай Форест) вызывают тяжелое лихорадочное заболевание у людей с высокой летальностью, которая может достигать 90 %. Данные о структуре вирусных белков обеспечивают понимание механизмов проникновения вируса в клетку и его репликации при инфицировании человека, что дает важную информацию для разработки терапевтических средств против этих особо опасных инфекций.

Другим ярким примером важности ИСИ в структурной биологии является беспрецедентная мобилизация усилий по оперативному определению топологии белков во время пандемии COVID-19. По состоянию на 2022 г. в базе данных PDB имеется более 1200 структур белков, связанных с новым коронавирусом SARS-CoV-2². Большинство этих структур было определено с помощью рентгеновской кристаллографии на ИСИ, причем первые структуры были депонированы еще до того, как 11 марта 2020 г. ВОЗ объявила о пандемии COVID-19. Среди них есть структуры цистеиновой

и основной протеазы Мрго, которые необходимы для репликации и транскрипции вируса и, следовательно, представляют собой важные терапевтические мишени для ингибирования размножения SARS-CoV-2 [44]. Кроме того, быстро появилось большое количество других пространственных структур, важных для разработки вакцин и противовирусных препаратов, например структура рецептор-связывающего домена RBD в комплексе с человеческим ангиотензин-превращающим ферментом 2 (ACE 2), обеспечивающим детальное структурное понимание начальных этапов инфекции. Кристаллографический скрининг сотен химических соединений на линии I04 Diamond Light Source в Великобритании позволил быстро отобрать из них потенциальные ингибиторы SARS-CoV-2 [45]. Эти результаты в совокупности дали детальную информацию о структуре вирусных белков, являющихся основными мишенями, что послужило основой для экспресс-разработки препаратов против COVID-19.

Тем не менее белковая кристаллография имеет свои ограничения: не всегда удается получить крупные кристаллы, в особенности когда речь идет о выращивании микрокристаллов мембранных белков, которые являются мишенями большинства лекарств, и не только противовирусных [46]. Эта проблема была частично решена с появлением фемтосекундной кристаллографии, основанной на сверхкоротких и чрезвычайно интенсивных рентгеновских импульсах лазеров на свободных электронах (XFEL), предопределивших новый исследовательский потенциал в различных научных областях. Это привело к открытию ряда

² COVID-19/SARSCoV-2 Resources. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://rcsb.org/covid19> (дата обращения: 12.03.2021).

новых структур рецепторов, связанных с G-белком (GPCR) [47, 48].

В случаях, когда белки не удается кристаллизовать, для их изучения может быть использовано малоугловое рентгеновское рассеяние (МУРР). МУРР представляет собой экспериментальный метод определения структурных характеристик биомакромолекул в растворе [49]. Поскольку образцы не нужно кристаллизовать, их можно изучать в средах с различными концентрациями солей и значениями pH, что позволяет установить взаимосвязь между структурой и функцией. Благодаря МУРР на линии B21 Британского Diamond Light Source стало возможным подтвердить, что С-концевая субъединица полимеразы PB2 вируса гриппа А взаимодействует с ГТФазой хозяина Rab11a через образование в растворе компактного складчатого комплекса [50]. На ИСИ Национального центра исследований синхротронного излучения (TPS, Синьчжу, Тайвань) была получена нативная конформация в растворе N-концевой геликазной области белка psP2, которая обладает нуклеотидтрифосфатазной и РНК-трифосфатазной активностью, и С-концевой цистеинпротеазной области белка psP2, которая отвечает за процессинг неструктурных полипротеинов вируса чикунгунья, что позволило объяснить ферментативные функции этого вирусного неструктурного белка [51].

Таким образом, ИСИ обеспечивают большой объем методов, позволяющих комплексно исследовать структуру вирусных белков.

Обсуждение. Очень часто на сложные биологические вопросы нельзя ответить, изучая их с помощью одного лишь инструмента, каким бы мощным он ни был. Биологические явления происходят в пространстве и времени, в различных масштабах, в различных условиях. Широкий спектр этих явлений требует гибридных подходов, использующих множество взаимодополняющих инструментов, каждый из которых охватывает различные аспекты проходящих процессов в различных пространственно-временных диапазонах. В идеале для получения полной картины изучаемого явления мы стремимся объединить как можно больше этих инструментов в отлаженный рабочий процесс. Рентгеновские методы, реализованные на ИСИ и обсуждаемые в этом обзоре, составляя фундаментальную основу этих гибридных подходов, приобретают все большее значение для вирусологических исследований и имеют блестящее будущее.

Заключение. В ходе данной работы был произведен анализ возможностей существующих источников синхротронного излучения для проведения вирусологических исследований от макроорганизмов до отдельных вирусных белков, что, в свою очередь, может способствовать созданию новых эффективных противовирусных препаратов. Анализ был выполнен на основе тщательного отбора научной литературы в поисковой системе PubMed, посвященной использованию рентгеновских методов, реализованных на источниках синхротронного излучения. Литературный обзор охватывает широкий исторический период времени начиная с 1958 года и до наших дней и показывает фундаментальную значимость синхротронного излучения для многих вирусологических исследований, общественного здравоохранения и обеспечения биологической безопасности России.

Список литературы / References

1. Fauci AS. Infectious diseases: considerations for the 21st century. *Clin Infect Dis*. 2001;32(5):675-685. doi: 10.1086/319235
2. Baker RE, Mahmud AS, Miller IF, *et al*. Infectious disease in an era of global change. *Nat Rev Microbiol*. 2022;20(4):193-205. doi: 10.1038/s41579-021-00639-z
3. Watson OJ, Barnsley G, Toor J, Hogan AB, Winskill P, Ghani AC. Global impact of the first year of COVID-19 vaccination: a mathematical modelling study. *Lancet Infect Dis*. 2022;22(9):1293-1302. doi: 10.1016/S1473-3099(22)00320-6
4. Abo-Bakr M, Feikes J, Holldack K, Wüstefeld G, Hübers HW. Steady-state far-infrared coherent synchrotron radiation detected at BESSY II. *Phys Rev Lett*. 2002;88(25 Pt 1):254801. doi: 10.1103/PhysRevLett.88.254801
5. Kendrew JC, Bodo G, Dintzis HM, Parrish RG, Wyckoff H, Phillips DC. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature*. 1958;181(4610):662-666. doi: 10.1038/181662a0
6. Thureau A, Roblin P, Pérez J. BioSAXS on the SWING beamline at Synchrotron SOLEIL. *J Appl Cryst*. 2021;54(6):1698-1710. doi: 10.1107/S1600576721008736
7. Günther B, Gradl R, Jud C, *et al*. The versatile X-ray beamline of the Munich Compact Light Source: design, instrumentation and applications. *J Synchrotron Radiat*. 2020;27(Pt 5):1395-1414. doi: 10.1107/S1600577520008309
8. LeBlanc GS, Boland MJ, Tan YRE. The Australian Synchrotron Project storage ring and injection system overview. *Proceedings of EPAC 2004, Lucerne, Switzerland*. 2004;4:2263-2265. Accessed December 9, 2022. <https://accelconf.web.cern.ch/e04/papers/thpkf005.pdf>
9. Einfeld D. Status of the ALBA Project. *Proceedings of IPAC'10, Kyoto, Japan*. 2006:3401-3403. Accessed December 9, 2022. <https://accelconf.web.cern.ch/ipac10/papers/wepea054.pdf>
10. Sawhney KJS, Dolbnya IP, Tiwari MK, *et al*. A test beamline on diamond light source. *AIP Conf Proc*. 2010;1234(1):387. doi: 10.1063/1.3463220
11. Tanaka H, Ishikawa T, Goto S, Takano S, Watanabe T, Yabashi M. Spring-8 upgrade project. *Proc. IPAC2016, Busan, Korea*. 2016;2867-2870. Accessed December 9, 2022. <https://accelconf.web.cern.ch/ipac2016/papers/wepow019.pdf>
12. Konstantinidis AC, Szafraniec MB, Rigon L, *et al*. X-ray performance evaluation of the Dexela CMOS APS X-ray detector using monochromatic synchrotron radiation in the mammographic energy range. *IEEE Trans Nucl Sci*. 2013;60(5):3969-3980. doi: 10.1109/TNS.2013.2276123
13. Raimondi P. ESRF-EBS: The extremely brilliant source project. *Synchrotron Radiat News*. 2016;29(6):8-15. doi: 10.1080/08940886.2016.1244462
14. Thomaston JL, Woldeyes RA, Nakane T, *et al*. XFEL structures of the influenza M2 proton channel: Room temperature water networks and insights into proton conduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(51):13357-13362. doi: 10.1073/pnas.1705624114
15. Dasgupta M, Budday D, de Oliveira SH, *et al*. Mix-and-inject XFEL crystallography reveals gated conformational dynamics during enzyme catalysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(51):25634-25640. doi: 10.1073/pnas.1901864116
16. Stagno JR, Liu Y, Bhandari YR, *et al*. Structures of riboswitch RNA reaction states by mix-and-inject XFEL serial crystallography. *Nature*. 2017;541(7636):242-246. doi: 10.1038/nature20599
17. Ponticello GS, Sugrue MF, Plazonnet B, Durand-Cavagna G. Dorzolamide, a 40-year wait. From an oral to a topical carbonic anhydrase inhibitor for the treatment of glaucoma. *Pharm Biotechnol*. 1998;11:555-574.
18. Abutaleb NS, Elhassanny AE, Flaherty DP, Seleem MN. In vitro and in vivo activities of the carbonic anhydrase inhibitor, dorzolamide, against vancomycin-resistant enterococci. *Peer J*. 2021;9:e11059. doi: 10.7717/peerj.11059

19. Burley SK, Berman HM, Kleywegt GJ, Markley JL, Nakamura H, Velankar S. Protein Data Bank (PDB): The single global macromolecular structure archive. *Methods Mol Biol.* 2017;1607:627–641. doi: 10.1007/978-1-4939-7000-1_26
20. Bukhtiyarov AV, Bukhtiyarov VI, Zhuravlev AN, *et al.* Synchrotron Radiation Facility “Siberian Circular Photon Source” (SRF SKIF). *Crystallogr Rep.* 2022;67(5):690–711. doi: 10.1134/S1063774522050029
21. Rankin S. CT and MRI. *Surgery (Oxford).* 2008;26(6):239–243. doi: 10.1016/j.mpsur.2008.04.010
22. Temple N, Donald C, Skora A, Reed W. Neuroimaging in adult penetrating brain injury: a guide for radiographers. *J Med Radiat Sci.* 2015;62(2):122–131. doi: 10.1002/jmrs.101
23. Brody DL, Mac Donald CL, Shimony JS. Current and future diagnostic tools for traumatic brain injury: CT, conventional MRI, and diffusion tensor imaging. *Handb Clin Neurol.* 2015;127:267–275. doi: 10.1016/B978-0-444-52892-6.00017-9
24. Astolfo A, Lathuilliere A, Laversenne V, Schneider B, Stamparoni M. Amyloid- β plaque deposition measured using propagation-based X-ray phase contrast CT imaging. *J Synchrotron Radiat.* 2016;23(Pt 3):813–819. doi: 10.1107/S1600577516004045
25. Hoshino M, Uesugi K, Yagi N. Phase-contrast X-ray microtomography of mouse fetus. *Biol Open.* 2012;1(3):269–274. doi: 10.1242/bio.2012430
26. Schulz G, Weitkamp T, Zanette I, *et al.* High-resolution tomographic imaging of a human cerebellum: comparison of absorption and grating-based phase contrast. *J R Soc Interface.* 2010;7(53):1665–1676. doi: 10.1098/rsif.2010.0281
27. Gradl R, Dierolf M, Hehn L, *et al.* Propagation-based phase-contrast X-ray imaging at a compact light source. *Sci Rep.* 2017;7(1):4908. doi: 10.1038/s41598-017-04739-w
28. Beltran MA, Paganin DM, Siu KKW, *et al.* Interface-specific x-ray phase retrieval tomography of complex biological organs. *Phys Med Biol.* 2011;56(23):7353–7369. doi: 10.1088/0031-9155/56/23/002
29. Pinzer BR, Cacquevel M, Modregger P, *et al.* Imaging brain amyloid deposition using grating-based differential phase contrast tomography. *Neuroimage.* 2012;61(4):1336–1346. doi: 10.1016/j.neuroimage.2012.03.029
30. Huang S, Kou B, Chi Y, *et al.* In-line phase-contrast and grating-based phase-contrast synchrotron imaging study of brain micrometastasis of breast cancer. *Sci Rep.* 2015;5:9418. doi: 10.1038/srep09418
31. Beltran MA, Paganin DM, Uesugi K, Kitchen MJ. 2D and 3D X-ray phase retrieval of multi-material objects using a single defocus distance. *Opt Express.* 2010;18(7):6423–6436. doi: 10.1364/OE.18.006423
32. Croton LC, Morgan KS, Paganin DM, *et al.* In situ phase contrast X-ray brain CT. *Sci Rep.* 2018;8(1):11412. doi: 10.1038/s41598-018-29841-5
33. Wang F, Zhou P, Li K, *et al.* Sensitive imaging of intact microvessels in vivo with synchrotron radiation. *IUCrJ.* 2020;7(Pt 5):793–802. doi: 10.1107/S2052252520008234
34. Umetani K, Uesugi K, Kobatake M, Yamamoto A, Yamashita T, Imai S. Synchrotron radiation microimaging in rabbit models of cancer for preclinical testing. *Nucl Instrum Methods Phys Res.* 2009;609(1):38–49. doi: 10.1016/j.nima.2009.07.058
35. Fratini M, Abdollahzadeh A, DiNuzzo M, *et al.* Multiscale imaging approach for studying the central nervous system: Methodology and perspective. *Front Neurosci.* 2020;14:72. doi: 10.3389/fnins.2020.00072
36. Pfeiffer F, Bunk O, David C, *et al.* High-resolution brain tumor visualization using three-dimensional x-ray phase contrast tomography. *Phys Med Biol.* 2007;52(23):6923–6930. doi: 10.1088/0031-9155/52/23/010
37. Cloetens P, Barrett R, Baruchel J, Guigay JP, Schlenker M. Phase objects in synchrotron radiation hard x-ray imaging. *J Phys D: Appl Phys.* 1996;29:133–146. doi: 10.1088/0022-3727/29/1/023
38. Chin AL, Yang SM, Chen HH, *et al.* A synchrotron X-ray imaging strategy to map large animal brains. *Chin J Phys.* 2020;65:24–32. doi: 10.1016/j.cjph.2020.01.010
39. Chichón FJ, Rodríguez MJ, Pereiro E, *et al.* Cryo X-ray nano-tomography of vaccinia virus infected cells. *J Struct Biol.* 2012;177(2):202–211. doi: 10.1016/j.jsb.2011.12.001
40. Dessen A, Volchkov V, Dolnik O, Klenk HD, Weissenhorn W. Crystal structure of the matrix protein VP40 from Ebola virus. *EMBO J.* 2000;19(16):4228–4236. doi: 10.1093/emboj/19.16.4228
41. Hartlieb B, Muziol T, Weissenhorn W, Becker S. Crystal structure of the C-terminal domain of Ebola virus VP30 reveals a role in transcription and nucleocapsid association. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(2):624–629. doi: 10.1073/pnas.0606730104
42. Bruhn JF, Kirchdoerfer RN, Urata SM, *et al.* Crystal structure of the Marburg virus VP35 oligomerization domain. *J Virol.* 2017;91(2):e01085–16. doi: 10.1128/JVI.01085-16
43. Zhu T, Song H, Peng R, Shi Y, Qi J, Gao GF. Crystal structure of the Marburg virus nucleoprotein core domain chaperoned by a VP35 peptide reveals a conserved drug target for filovirus. *J Virol.* 2017;91(18):e00996–17. doi: 10.1128/JVI.00996-17
44. Douangamath A, Fearon D, Gehrtz P, *et al.* Crystallographic and electrophilic fragment screening of the SARS-CoV-2 main protease. *Nat Commun.* 2020;11(1):5047. doi: 10.1038/s41467-020-18709-w
45. Jin Z, Du X, Xu Y, *et al.* Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature.* 2020;582(7811):289–293. doi: 10.1038/s41586-020-2223-y
46. Gusach A, Luginina A, Marin E, *et al.* Structural basis of ligand selectivity and disease mutations in cysteinyl leukotriene receptors. *Nat Commun.* 2019;10(1):5573. doi: 10.1038/s41467-019-13348-2
47. Lyapina E, Marin E, Gusach A, *et al.* Structural basis for receptor selectivity and inverse agonism in S1P5 receptors. *Nat Commun.* 2022;13(1):4736. doi: 10.1038/s41467-022-32447-1
48. Marin E, Luginina A, Gusach A, *et al.* Small-wedge synchrotron and serial XFEL datasets for Cysteinyl leukotriene GPCRs. *Sci Data.* 2020;7(1):388. doi: 10.1038/s41597-020-00729-2
49. Putnam DK, Lowe EW Jr, Meiler J. Reconstruction of SAXS profiles from protein structures. *Comput Struct Biotechnol J.* 2013;8:e201308006. doi: 10.5936/csbj.201308006
50. Veler H, Fan H, Keown JR, *et al.* The C-terminal domains of the PB2 subunit of the influenza A virus RNA polymerase directly interact with cellular GTPase Rab11a. *J Virol.* 2022;96(5):e0197921. doi: 10.1128/jvi.01979-21
51. Law YS, Wang S, Tan YB, *et al.* Interdomain flexibility of Chikungunya virus nsP2 helicase-protease differentially influences viral RNA replication and infectivity. *J Virol.* 2021;95(6):e01470–20. doi: 10.1128/JVI.01470-20

