



Оптическая ультраструктурная вирометрия и ее ограничения*

О. В. Градов¹, Ю. В. Жуланов², П. Ю. Макавеев²

¹ Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н. Н. Семенова Российской академии наук (ФИЦ ХФ РАН бывш. ИХФ РАН)

² Научно-исследовательский физико-химический институт имени Л. Я. Карпова

Идентификации типоразмеров вирусных, агрегационных и иных частиц с помощью анализа потока вирионов по спектру светорассеяния и флуоресценции требует предварительной калибровки измерительного инструмента. Калибровка должна идти по конкретным геометрическим прототипам, имеющим определенные размеры. Однако размеры вирусов колеблются в широком диапазоне длин от нано- до субмикрометровых размеров. Это создает неопределенность измерений для широкого ряда вирусов. Программное обеспечение широко внедряемых оптических инструментов базируется на упрощенной интерпретации теории рассеяния света Ми, распространяя ее практически на весь диапазон размеров частиц, даже субмикрометровых. В обзоре рассмотрены метрологические проблемы оптической вирометрии, даны предложения решения вопросов калибровки инструментов.

Ключевые слова: вирометрия, оптические аэрозольные счетчики, гидрозолевые счетчики, диффузионный аэрозольный спектрометр

Статья поступила: 04.05.2020

Принята к публикации: 24.06.2020

* *Примечание редактора* – Методы вирометрии – это методы регистрации оптических параметров, находящихся в потоке вирионов, по сигналам светорассеяния и флуоресценции. Вирион – вирусная частица, находящаяся вне живой клетки. Вирионы большинства вирусов не проявляют никаких признаков биологической активности, пока не соприкоснутся с клеткой-хозяином, после чего образуют комплекс «вирус – клетка», способный жить и производить новые вирионы.

Optical Ultrastructural Virometry and Its Limitations*

O. V. Gradov¹, U. V. Zhulanov², P. U. Makaveev²

¹ N. N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences

² Karpov Institute of Physical Chemistry

The identification of the standard sizes of viral, aggregative and other particles using the virion flow analysis by the light-scattering and fluorescence spectrum requires preliminary calibration of the measuring instrument. Calibration should be carried out according to specific geometric prototypes with specific dimensions. However, the size of viruses varies over a wide range of lengths ranging from nano- to submicrometer sizes. This leads to measurement uncertainty for a wide range of viruses. The software for widely implemented optical instruments is based on a simplified interpretation of the Mie scattering theory, extending it to almost the entire range of particle sizes, even submicrometer ones. The review examines the metrological problems of optical virometry and offers solutions to the issues of instrument calibration.

Keywords: virometry, light-scattering aerosol counters, hydrosol particle counters, diffusion aerosol spectrometers

The article was received: 04.05.2020

The article was accepted: 24.06.2020

Along with optical cytometry based on the analysis of a fluorescent (or scattered by a cell [1, 2]) light signal, virometry methods have also shown their effectiveness in recent years. This became especially noticeable when using the flow virometry [3, 4], which was named similarly to flow cytometry (FACS, FCM).

* *Editor's note* – Virometry methods are methods of recording the optical parameters of virions in a flow using light-scattering and fluorescence signals. Virion is a virus particle located outside of a living cell. Virions of most viruses do not show any signs of biological activity until they come into contact with a host cell,



Наряду с оптической цитометрией, базирующейся на анализе флуоресцентного (либо рассеиваемого клеткой [1, 2]) светового сигнала, в последние годы свою эффективность проявили методы виromетрии. Особенно это стало заметно при использовании метода проточной виromетрии [3, 4], получившего свое название по аналогии с проточной цитометрией (FACS, FCM). Комплекс технологий виromетрии – уникальное средство анализа инфекционных профилей [5], антигенных спектров [6], кинетического анализа вирусного инфицирования, а также конформационной кинетики и компаративного анализа химизма отклика, по сравнению с нормой реакции [7]. Основной акцент при анализе делается на молекулярно-биологическом аспекте – а не на ультраморфологических и размерных (дисперсных) отличиях вирусов.

Обратим внимание на тот факт, что Национальные институты здоровья США в рамках своей текущей политики делают акцент на счетном количестве вирусов. Особенно это касается исследований вируса HIV-1, ответственного за пандемию СПИДа (HIV-1 относится к подсемейству ретровирусов *Lentiviridae* [8]). То есть по факту речь идет о чрезвычайно таксономически ограниченном подмножестве релевантных аналитов и препаратов, а также равнозначно ограниченной номенклатуре вариаций вирусов [9–11]. В силу этого говорить об универсальности данного метода в диагностической вирусологии, очевидно, не приходится.

Универсальный метод не может быть основан на селективных (в молекулярно-биологическом аспекте) носителях. Особенно это замечание относится к супрамолекулярным системам с высокой специфичностью комплементарной фиксации, к которым относятся генетические механизмы вирусов. Создать систему, эквивалентно распознающую все типы вирусов, в принципе невозможно. И в этом проявляется ограниченность метода. (Подразумеваются система для ДНК-, так и РНК-; с одонитевым или двухнитевым ДНК-геномом либо односпиральным или двуспиральным РНК-геномом; для всех форм капсомеров, т.е. белковых субъединиц/протомеров капсид – внешних вирусных оболочек; с учетом вероятностей обнаружения в пробах как непокрытых дополнительной оболочкой [*viral envelope*] вирусов, так и вирусов с ксеногенным липидным суперкапсидом). Постановка настолько универсализированной задачи противоречит филогенетическому многообразию молекулярной таксономии вирусов.

Подчеркнем, что размеры вирусов находятся в диапазоне субволновых длин. Поэтому селек-

The complex of virometry technologies is a unique tool for analyzing infection profiles [5], antigenic spectra [6], kinetic analysis of virus infection, as well as conformational kinetics and comparative analysis of response chemistry, in comparison with the reaction norm [7]. The analysis is mainly focused on the biomolecular aspect, and not on the ultramorphological and size (disperse) differences of viruses.

It should be noted that the USA National Institutes of Health, as part of their current policy, are focusing on the countable number of viruses. This is especially true for studies of the HIV-1 virus, which is responsible for the AIDS pandemic (HIV-1 belongs to the *Lentiviridae* subfamily of retroviruses [8]). This means that the subset of relevant analytes and drugs, as well as the nomenclature of viral variations, are extremely taxonomically limited [9–11]. Therefore, this method of diagnostic virology cannot be considered universal.

Universal method cannot be based on selective (from biomolecular perspective) carriers. This statement especially applies to supramolecular systems with high specificity of complementary fixation, including the genetic mechanisms of viruses. In principle, it is impossible to create a system capable of equivalent recognition of all types of viruses. This is the limitation of the method. (This implies a system for both DNA and RNA; with a single-stranded or double-stranded DNA genome or a single-stranded or double-stranded RNA genome; for all forms of capsomers, i. e. – protein subunits/capsid protomers – outer viral envelopes; taking into account the probabilities of detection in samples of both viruses not coated with viral envelope and viruses with xenogenic lipid supercapsid). The statement of such universalized problem contradicts the phyletic diversity of the molecular taxonomy of viruses.

It should be emphasized that the sizes of viruses are in the range of subwavelengths. Therefore, selective fluorescence methods of flow virometry are also not universal for detecting viruses of various geometric shapes. This is due to the indistinguishability of their optical signal (exceptions are PALM/STORM and similar microfluorimetric methods).

It should be noted that the equipment with which modern core facility centers (core facilities) [12] are equipped has limitations. For example, the BD LSRFortessa SORP cell analyzer is optimized for the size of lymphocytes, monocytes and granulocytes. The method used in the autoMACS Pro fluorescent magnetic bioparticle counter prevents counting of single virus particles. The BD FACS Celesta multicolor flow cytometer (available with 488, 405, 650, 355, and 561 nm lasers) is not capable of measuring

after which they form a cell-virus system capable of living and producing new virions).



тивные флуоресцентные методы проточной виromетрии также не обладают универсальностью для обнаружения вирусов различных геометрических форм. Это происходит в силу неразличимости оптического сигнала от них (исключения составляют PALM/STORM-подобные микрофлуориметрические методы).

Надо учесть, что оборудование, которым оснащены современные центры коллективного пользования (core facilities) [12], имеет ограничения. Например, клеточный анализатор (cell analyzer) BD LSRFortessa SORP оптимизирован под размеры лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов. Метод, заложенный в магнитный флуоресцентный счетчик биочастиц autoMACS Pro, препятствует счету одиночных вирусных частиц. Многоцветный проточный цитометр BD FACS Celesta (с комплектацией лазерами на длинах волн 488, 405, 650, 355 и 561 нм) не имеет возможности измерять структуры, порядка размеров вирусных и иных генетических частиц. Надо учитывать помехи из-за паразитных флуоресцентных сигналов, вызванных излучением УФ-диапазона (подобные эффекты уже наблюдались ранее при работе с УФ-микроскопами).

Но если вирусы обладают морфологическим различием (*in adjecto* – различаются геометрическим типом капсида, белковой оболочки вируса), то индикатрисы рассеяния светового потока будут тоже различаться между собой. Когда капсиды вирусов имеют спиральные, икосаэдрические, продолговатые и комплексные формы, это отражается на форме индикатрисы рассеяния. Правда, стоит учитывать, что эти различия могут уверенно наблюдаться только в приборах, прошедших калибровку.

А процедуры калибровки для таких измерительных систем представляют собой отдельный научный вопрос. Для калибровки должны быть выбраны тестовые частицы, адекватные по геометрии и размерам исследуемым вирусам. В идеале они должны обладать автоморфизмом к геометрическим размерам вирусных частиц. Например, быть вирусом той же морфологии, но инактивированного или непатогенного типа, либо быть гомеоморфной к нему. Морфизм, не обеспечивающий взаимно-однозначного соответствия между структурой исследуемого и калибровочного вируса (калибровочной частицы) не вполне достаточен для идентификации. Причина в том, что несоответствие может стать источником появления артефактов в расшифровываемой дифракционной картине (см. рисунок).

Но в методе проточной виromетрии частиц при сохранении идентичных групп симметрии у калибровочных и измеряемых частиц калибровка с их

structures of the order of the size of viral and other genetic particles. Interference due to parasitic fluorescent signals caused by UV radiation (similar effects have already been observed when using UV microscopes) should be taken into account.

However, if viruses have a morphological difference (*in adjecto* – differ in the geometric type of the capsid, the protein envelope of the virus), then the light flux scattering indicatrices will also differ among themselves. When the capsids of viruses have spiral, icosahedral, oblong and complex shapes, this is reflected in the shape of the scattering indicatrix. It should also be taken into account that these differences can be constantly observed only in calibrated devices.

Calibration procedures for such measuring systems represent a separate scientific issue. Test particles that correspond in geometry and size to the viruses under study should be selected for calibration. Ideally, they should be automorphic to the virus. For example, to be a virus of the same morphology (i. e. geometry), but inactivated or non-pathogenic type, or be homeomorphic to it. The morphism that does not provide a one-to-one correspondence between the structure of the studied virus and the calibration virus (calibration particle) is not quite sufficient for identification. The reason is that the discrepancy can become a source of artifacts in the decoded diffraction pattern.

However, in the flow virometry, if identical symmetry groups are maintained for the calibration and measuring particles, calibration of the measuring system is possible with their help. A textbook example: a rotavirus with icosahedral symmetry is effectively approximated by a spherical pattern due to the large number of capsomeres (*a capsomere is a repeating group of virion structural protein molecules that form an ordered capsid structure*). In the language of fractal geometry this is called peritiling [13].

The developers of scanning flow spectrometers (BioUniScan, Novosibirsk) state that in order to determine the characteristics of particles, it is necessary to solve the inverse problem of light-scattering. This problem is nontrivial even for the case of observation of spherical homogeneous particles of the sublong-wavelength range. Preliminary calibration of the system is as much know-how as the control algorithm/measurement protocol.

It is well known that the sizes of viruses in different taxonomic groups differ by orders of magnitude: from 20 to 300 nm. Although some members of the *Filoviridae* family with negative single-stranded RNA are up to 1.4 μm in length and 0.08 μm in diameter. And in *Pandoravirus sp.* and *Pithovirus sp.*, the level of genome compaction, in principle, physically allows going far beyond the micrometer boundaries 1.0–0.5 μm / 1.5–0.5 μm , respectively.

This implies a qualitative difference in metrology and analysis principles for these qualitatively different groups.

помощью измерительной системы возможна. Хрестоматийный пример: ротавирус, имеющий икосаэдрическую симметрию эффективно аппроксимируется сферическим паттерном в силу большого количества капсомеров (*капсомер* – повторяющаяся группа молекул структурного белка вириона, образует упорядоченную структуру капсида. Что, переходя на язык фрактальной геометрии, именуется как *пертайлинг*) [13].

Разработчики сканирующих проточных спектрометров («BioUniScan», Новосибирск) констатируют, что для определения характеристик частиц необходимо решать обратную задачу светорассеяния. Задача нетривиальная даже для случая наблюдения сферических гомогенных частиц субдлинноволнового диапазона. Предварительная калибровка системы является таким же «ноу-хау», как и управляющий алгоритм/протокол измерений.

Общеизвестно, что размеры вирусов в разных таксономических группах отличаются на порядки величин: от 20 до 300 нм. Хотя некоторые представители семейства *Filoviridae* с одноцепочечной РНК отрицательной полярности имеют длину до 1,4 мкм при поперечнике 0,08 мкм. А у *Pandoravirus sp.* и *Pithovirus sp.* уровень компактизации генома, в принципе, физически допускает выход далеко за границы микрометра 1,0–0,5 мкм/1,5–0,5 мкм соответственно.

Из чего следует качественное различие метрологии и принципов анализа для этих качественно отличных групп. Несмотря на распространенное упрощение, сводимое к экстраполяции интерпретаций теории рассеяния света Ми практически на весь диапазон размеров частиц (включая дифракцию Фраунгофера как частный случай), хорошо известна неправомочность теории Ми при малых параметрах дифракции. Вычислительные возможности, обеспечиваемые теорией Ми, допускают применение одного метода/алгоритма расчетов для аддитивного спектра дисперсности, то есть размеров частиц.

Выскажем гипотезу, что эта экстраполяция в рамках измерений индикатрис световых пучков, прошедших сквозь поток с вирусами, является заблуждением. По факту, получается, что часть пробы с вирусами будет обчислена неправильно. Поясним это утверждение.

Использовать упрощенные расчеты возможно только в случае, когда речь идет о монодисперсных калибровочных средах, например специальных латексах. Они обладают гомоскедастичностью статистических распределений. Но при рассмотрении сред, в которых содержатся отдельные частицы, различающиеся как по статической геометрии, так и по динамическим морфометрическим параметрам



Причины появления артефактов при использовании калибровочных латексных частиц: а – различия капель по размерам (гетеродисперсность) и отклонение их формы от сферической; б – слипание частиц между собой и их адгезия к субстрату (агрегаты из двух частиц система интерпретирует как одну удлиненную частицу); с – наличие лопнувших и деформированных в процессе эксплозии либо имплозии частиц

The reasons for the appearance of artifacts are defects of the calibration latex particles: a – differences in droplet size (heterodispersity) and deviation of their shape from spherical; b – adhesion of particles to each other and their adhesion to the substrate (aggregates of two particles are interpreted by the system as one elongated particle); c – the presence of burst and deformed particles in the process of explosion or implosion



трам, проявляется гетероскедастичность распределения. Это приводит к неэффективности оценок, так как невозможно заранее знать значения концентрации отдельных частиц и вклад в дифракционную картину дисперсных фракций (или размеров ультраструктурных и микроструктурных единиц биоматериала). В динамике они отличаются от оценок, выполненных как по статической геометрии, так и по динамическим морфометрическим параметрам. Эти критерии в норме реакции являются нестационарным коррелятом общей реактивности протоплазмы/виروплазмы и распространения возбуждения в ней [14, 15]. А квалиметрический весовой критерий в таких задачах вычислить трудно в силу различий геометрий («форм-факторов») частиц.

Говорят, что «если все частицы в пробе больше, чем длина волны света, часть теории Фраунгофера доминирует в теории Ми при расчетах размеров частиц». Но, учитывая анизометрические частицы (к которым относятся и вирусы – те же *Filoviridae* с невероятным коэффициентом «прозенхимности», как называлось бы это свойство в случае цитометрии клеток растений, по Тахтаджяну: до 1,4 к 0,08), говорить об объективном численном выражении указанного доминирования (особо – без учета ориентации), не приходится в большинстве фактически реализуемых случаев.

Машиннорешаемые абстрактные модели, применимые для вычисления распределений, базируются на допущении о сферической форме частиц. Поэтому распределение частиц по размеру, получаемое в результате анализа, на самом деле является распределением «эквивалентных сферических частиц», а не реальных частиц аналита. (Напомним, что классическая задача электродинамики, решенная в 1908 году Густавом Ми, решается разложением электромагнитного поля на сферические гармоники).

Для вирусов, различающихся по морфологии и генетическому или эволюционному положению, геометрические отклонения от сферы будут различными. Поэтому эффективность эквивалентных измерений будет отличаться для систематически различных вирусов. Говорить об универсальной технологии «функциональной вирометрии» в таком случае невозможно, поскольку размеры номенклатуры даже наиболее распространенных или релевантных для инфекционистов вирусов экстремально варьируют. Следовательно, дифракционные пределы и границы оптимумов применимости того или иного математического подхода, в том числе отличного от теории Ми, варьируются тоже.

Despite the widespread simplification, which amounts to extrapolation of the Mie scattering theory interpretations practically to the entire range of particle sizes (including Fraunhofer diffraction as a special case), it is well known that the Mie theory is not suited for small diffraction parameters. The computational capabilities provided by the Mie theory allow the use of one calculation method/algorithm for the additive spectrum of dispersion, that is, particle sizes.

Let us hypothesize that this extrapolation within the framework of measurements of the indicatrices of light beams that have passed through a virus flow is a mistake. This means that part of the sample with viruses will be calculated incorrectly. Let us explain this statement.

It is possible to use simplified calculations only when it comes to monodisperse calibration media, for example, special latexes. They are homoscedastic. As for media containing individual particles that differ both in static geometry and in dynamic morphometric parameters, the heteroscedasticity of the distribution appears. This leads to inefficiency of the assessments, since it is impossible to know in advance the concentration values of individual particles and the contribution to the diffraction pattern of dispersed fractions (or the sizes of ultrastructural and microstructural units of biomaterial). In dynamics, they differ from the assessments performed both according to static geometry and according to dynamic morphometric parameters. These criteria in the reaction norm are a nonstationary correlate of the general reactivity of protoplasm/vioplasm and the propagation of excitation in it [14, 15]. And the qualimetric weighting criterion is difficult to calculate in such problems due to the differences in the geometry (“form factors”) of the particles.

It is said that “if all the particles in the sample are greater than the light wavelength, then part of Fraunhofer theory dominates Mie theory when calculating the particle sizes”. However, after taking into account the anisometric particles (which include viruses – for instance, *Filoviridae* with an incredible “prosenchymness” coefficient, as this property would be called in the case of plant cell cytometry, according to Takhtadzhian: up to 1.4 to 0.08), an objective numerical expression of the indicated dominance is out of the question (especially, without taking into account orientation) in most realized cases.

Machine-solvable abstract models for calculation of distributions are based on the assumption that the particles have spherical shape. Therefore, the distribution of the particles by size obtained from the analysis is actually the distribution of the “equivalent spherical particles” and not of the actual analyte particles. (It is worth reminding that the classical problem of electrodynamics, solved in 1908 by Gustav Mie, is solved by decomposing the electromagnetic field into spherical harmonics).

А функциональная активность вирулентно-различных форм, как правило, сравнительно слабо коррелирует с усредненной морфологией, вычисляемой в ходе поточной обработки данных с детектора проточного устройства. Даже при принятии допущения, что измерения вирусов ведутся не на дисперсных носителях, а в абстрактной пустой среде с отсутствием адсорбирующих агентов, калибровка измерительной системы будет неэффективна [16]. Если говорить о недостаточности информации для функциональной идентификации, то следует также упомянуть, что теория Ми требует знания коэффициентов преломления и поглощения образца (очевидно, неидентичного для разных потенциальных вирусов) и «дисперсионной среды», которая в нативном случае также характеризуется некоторой неопределенностью, поскольку необходимо анализировать образцы из различных сред.

Очевидно, что в случае анализа нативных сред, возможности окрашивания вирусных частиц (особенно инактивированных), также существенно ограничены. Эта методика используется для окрашивания SyBR green-I [17, 18]; не фиксированных на дисперсных частицах (нанозолота etc.) либо в агарозных иммобилизующих шариках [19]; для экспрессии флуоресцентных белков, не модифицированных генетически, после проникновения в клетку [20, 21].

Особо сложно идентифицировать, анализировать и измерять в естественной среде распространения инфекционные вирусные агенты, которые передаются аэрозольным (воздушно-капельным) путем. К таковым, из наиболее известных, распространенных и легко дифференцируемых заболеваний, обладающих выраженной этиологией, относится существенный пласт инфекций. Его рассмотрение начинается с ОРВИ (Upper Respiratory Tract Infections; URTI), объединяющего в себе респираторно-синцитиальную вирусную инфекцию, риновирусную и аденовирусную инфекции. Продолжают ряд вирусы гриппа/парагриппа, кори, эпидемического паротита, аденовирусной инфекции и т. д.

Определение вирусов без культивации может быть реализовано только в абиогенной среде их распространения. Поэтому для инфекций, передающихся воздушно-капельным (аэрозольным) путем, необходимо внедрение метода, обеспечивающего анализ с захватом частиц в естественной атмосфере.

В то же время, как правило, в физиологических аэрозолях размер капель может существенно превышать сами размеры вирусов. Однако и в стан-

For viruses that differ in morphology and genetic or evolutionary position, geometric deviations from the spherical shape will be different. Therefore, the effectiveness of equivalent measurements will differ for systematically different viruses. In this case, the universal technology of “functional virometry” is impossible, since the size of the nomenclature of even the most widespread or relevant viruses varies extremely. Consequently, the diffraction limits and the limits of the optima of applicability of one or another mathematical approach, including the one that differs from Mie theory, also vary.

The functional activity of different virulent forms usually correlates relatively weakly with the averaged morphology calculated in the course of in-line processing of the data from the flow device detector. Even if it is assumed that the measurements of viruses are not carried out on dispersed media, but in an abstract empty environment with the absence of adsorbing agents, the calibration of the measuring system will still be ineffective [16]. Regarding the information insufficiency for functional identification, it should also be noted that Mie theory requires knowledge of the refractive and absorption coefficients of the sample (different for different potential viruses) and the “dispersion medium”, which in the native case is also characterized by some uncertainty, since it is necessary to analyze samples from different environments.

It is apparent that in the case of the analysis of native media, the possibilities of staining viral particles (especially inactivated ones) are also significantly limited. This method is used for staining SyBR green-I [17, 18]; not fixed on disperse particles (nanogold, etc.) or in agarose immobilization beads [19]; for expression of non-genetically modified fluorescent proteins after penetration into the cell [20, 21].

It is especially difficult to identify, analyze and measure aerosol-transmissible infectious viral agents in the natural transmission environment. These, of the most famous, common and easily differentiated diseases with a pronounced etiology, include a significant number of infections, such as URTI (Upper Respiratory Tract Infections), which combines respiratory syncytial virus infection, rhinovirus and adenovirus infections; influenza/parainfluenza, measles, mumps, adenovirus infection, etc.

Determination of viruses without cultivation can be realized only in the abiogenic transmission environment. Therefore, for aerosol-transmissible infections, it is necessary to introduce a method that provides analysis with the capture of particles in the natural atmosphere.

At the same time, the droplet size in physiological aerosols usually can significantly exceed the size of the virus. However, the virus aggregation effect is also apparent in standard virometry. Therefore, the “viral aggregometry” method is implemented in standard flow cytometers



дартной виromетрии известен эффект агрегации вирусов. Поэтому на стандартных проточных цитометрах (FACS) реализуется методика «вирусной агрегометрии». Именно с ее помощью проходит детектирование HSV-1 и ряда других агрегирующих вирусных частиц с размерами агрегатов выше предела 300–500 нм.

Эти ограничения могут быть преодолены при использовании лазерных аэрозольных спектрометров. Всплеск интереса к аэрозольным и гидрозольным оптическим счетным системам появился в 1970-х годах [22]. Тогда изучались субмикронные частицы жаркой (аридной) зоны и вариации аэрозольных параметров в высокогорных условиях с повышенной инсоляцией и пониженным давлением [23, 24]. Позже, в 1980-е годы, аэрозольные счетчики Жуланова работали на Венере на советских космических аппаратах ВЕГА-1 и ВЕГА-2 [25]. С их помощью проводили изучение структуры облачных слоев и размерное распределение аэрозоля венерианской атмосферы [26, 27], изучали механизм возникновения облачных слоев [28].

Диффузионные аэрозольные спектрометры Жуланова с соавторами осуществляют измерение спектра размеров в диапазоне от размера молекулярных кластеров до долей микрона, то есть могут быть оптимизированы для большинства виromетрических задач, не использующих флуоресцентных меток и гранул (beads). Например, модификация 2702 осуществляет мониторинг в диапазоне 3–200 нм, хотя существует возможность расширения верхнего диапазона до N-микронных масштабов (вплоть до 10 мкм).

Оптические методы виromетрии субмикронного диапазона имеют высокий потенциал в решении задач анализа причин формирования самоорганизующихся вирусных структур или частиц [29, 30], магнитных гибридных «металлорганических» вирусных частиц [31]). Более того, лазерную аэрозольную спектрометрию можно использовать при решении вопросов выживаемости генетического вирусного материала в космических условиях, а также к смежным проблемам космической биологии/астробиологии и т. н. «космического абиогенеза» на базе зольных частиц [32, 33] или вирусно-опосредованной панспермии (либо астрозольного переноса [34, 35]) и иных проблем газофазной экзобиологии [36, 37].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оптические методы виromетрии субмикронного диапазона могут быть с успехом имплементированы в любых средах, благоприятствующих размно-

(FACS). The detection of HSV-1 and a number of other aggregating virus particles with aggregate sizes above the limit of 300–500 nm is achieved due to this method.

These limitations can be overcome by using laser aerosol spectrometers. A surge of interest in aerosol and hydrosol optical counters appeared in the 1970s [22]. At that time, submicron particles of the torrid (arid) zone and variations of aerosol parameters were studied in high-altitude conditions with increased insolation and decreased pressure [23, 24]. Later, in the 1980s, Zhulanov's aerosol counters operated on Venus on the Soviet spacecrafts VEGA-1 and VEGA-2 [25]. They were used to study the structure of cloud layers and the size distribution of the aerosol of the Venusian atmosphere [26, 27], as well as the mechanism of the formation of cloud layers [28].

Zhulanov's diffusion aerosol spectrometers measure a spectrum of sizes ranging from the size of molecular clusters to fractions of a micron, that is, they can be optimized for most virometric tasks that do not involve fluorescent tags and beads. There is a modification for monitoring particles with a size of 3–200 nm. This modification allows expanding the upper limit up to 10 microns.

Optical methods of virometry in the submicron range have a high potential in solving problems of analysis of the causes of the formation of self-organizing virus structures or particles [29, 30], magnetic hybrid “organometallic” viral particles [31]. Moreover, laser aerosol spectrometry can be used in survival studies of viral genetic material in space conditions, as well as in related problems of space biology/astrobiology and so-called “space abiogenesis” on the basis of sol particles [32, 33] or virus-mediated panspermia (or astrosole transport [34, 35]) and other problems of gas-phase exobiology [36, 37].

CONCLUSION

Optical methods of virometry in the submicron range can be successfully implemented in any environment that favors or prevents the replication of viral material. And the issues of the selection of calibration particles in laser-aerosol-spectrometric studies are solved differently if the principles of dynamic light-scattering are used.

ABOUT AUTHORS

Gradov Oleg Valerievich, e-mail: o.v.gradov@gmail.com, Senior Researcher, Department of Dynamics of Chemical and Biological Processes, Institute of Chemical Physics named after Semenov, Moscow, Russia.
Area of interest: microfluidics, patch clamp, ESEM, CLEM, lensless microscopy, YMD, DIC, SPIM, LSFM, biophysical instrumentation
ORCID: 0000-0001-5118-6261

Zhulanov Yuri Vasilievich, Cand. of Scien. (Phys.-Math.), senior researcher, Karlov Institute of Physics Chemistry, Moscow, Russia.
ORCID: 0000-0003-2494-5693

Makaveev Pavel Yurievich, designer of aerosol spectrometers and counters, Karlov Institute of Physics Chemistry, Moscow, Russia.
ORCID: 0000-0002-4026-2828



жению вирусного материала или препятствующих такому. И вопросы подбора калибровочных частиц при лазерно-аэрозольно-спектрометрических изысканиях решаются иначе, если использовать принципы динамического светорассеяния.

АВТОРЫ

Градов Олег Валерьевич, с. н. с., Отдел динамики химических и биологических процессов, Институт химической физики им. Семенова, Москва, Россия. Область интересов: микрофлюидика, патч-кламп, ESEM, CLEM, безлинзовая микроскопия, YMD, DIC, SPIM, LSFM, биофизическое приборостроение
ORCID: 0000-0001-5118-6261

Жуланов Юрий Васильевич, к. ф. - м. н., с. н. с., Научно-исследовательский физико-химический институт им. Л. Я. Карпова, Москва, Россия.
ORCID: 0000-0003-2494-5693

Макаев Павел Юрьевич, конструктор аэрозольных спектрометров и счетчиков, Научно-исследовательский физико-химический институт им. Л. Я. Карпова, Москва, Россия.
ORCID: 0000-0002-4026-2828

REFERENCES

- Maltsev V. P., Chernyshev A. V., Sem'yanov K. A., Soini E. Absolute real-time measurement of particle size distribution with the flying light-scattering indicatrix method. *Applied optics*. 1996; 35(18): 3275–3280.
- Shvalov A. N., Surovtsev I. V., Chernyshev A. V., Soini J. T., Maltsev V. P. Particle classification from light scattering with the scanning flow cytometer. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. 1999; 37(3): 215–220.
- Zamora J. L. R., Aguilar H. C. Flow virometry as a tool to study viruses. *Methods*. 2018; 134: 87–97.
- Zicari S., Arakelyan A., Fitzgerald W., Zaitseva E., Chernomordik L. V., Margolis L., Grivel J. C. Evaluation of the maturation of individual Dengue virions with flow virometry. *Virology*. 2016; 488: 20–27.
- Gaudin R., Barteneva N. S. Sorting of small infectious virus particles by flow virometry reveals distinct infectivity profiles. *Nature communications*. 2015; 6: 6022.
- Arakelyan A., Fitzgerald W., Zicari S., Vagida M., Grivel J. C., Margolis L. Flow Virometry to Analyze Antigenic Spectra of Virions and Extracellular Vesicles. *Journal of visualized experiments*. 2017; 119.
- Landowski M., Dabundo J., Liu Q., Nicola A. V., Aguilar H. C. Nipah Virion Entry Kinetics, Composition, and Conformational Changes Determined by Enzymatic VLPs and New Flow Virometry Tools. *Journal of virology*. 2014; 88(24): 14197–14206.
- Bonar M. M., Tilton J. C. High sensitivity detection and sorting of infectious human immunodeficiency virus (HIV-1) particles by flow virometry. *Virology*. 2017; 505: 80–90.
- DeSantis M. C., Kim J. H., Song H., Klasse P. J., Cheng W. Quantitative correlation between infectivity and Gp120 density on HIV-1 virions revealed by optical trapping virometry. *Journal of Biological Chemistry*. 2016; 291(25): 13088–13097.
- Arakelyan A., Fitzgerald W., King D., Barreto-de-Souza V., Zicari S., Grivel J.-C., Shattock R., Margolis L. Some HIV-1 virions are more equal than others: mosaics of envs on individual HIV virions as evaluated with flow virometry. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2016; 71: 68.
- Arakelyan A., Fitzgerald W., King D. F., Rogers P., Cheeseman H. M., Grivel J., Shattock R. J., Margolis L. Flow virometry analysis of envelope glycoprotein conformations on individual HIV virions. *Scientific reports*. 2017; 7(1): 948.
- University of Florida. Center for Immunology & Transplantation. URL: <https://immunology.ufl.edu/instrumentation>.
- Schroeder M. Fractals, chaos, power laws. – Dover, Mineola, 2009. 430 p.
- Nasonov D. N. *Mestnaya reakciya protoplazmy i rasprostranyayushcheesya vozбуждение*. 2 izd. – М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1962.
Насонов Д. Н. *Местная реакция протоплазмы и распространяющееся возбуждение*. 2 изд. – М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1962.
- Nasonov D. N. *Local reaction of protoplasm and gradual excitation*. National Science Foundation (USA). Washington, by the Israel Program for Scientific Translations; [available from the Office of Technical Services, U. S. Dept. of Commerce, Washington], 1962. 425 p.
- Lippé R. Flow virometry: a powerful tool to functionally characterize viruses. *Journal of virology*. 2018; 92(3): e01765–17.
- Marie D., Brussaard C. P. D., Thyraug R., Bratbak G., Vaulot D. Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. *Applied Environmental Microbiology*. 1999; 65, p. 45–52.
- Brussaard C. P. Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry. *Applied Environmental Microbiology*. 2004; 70: 1506–1513.
- Rappé M. S., Giovannoni S. J. The uncultured microbial majority. *Annual Reviews in Microbiology*. 2003; 57: 369–394.
- Loret S., El Bilali N., Lippé R. Analysis of herpes simplex virus type 1 nuclear particles by flow cytometry. *Cytometry A*. 2012; 81: 950–959.
- El Bilali N., Duron J., Gingras D., Lippé R. Quantitative evaluation of protein heterogeneity within herpes simplex virus 1 particles. *Journal of Virology*. 2017; 91: E00320.
- Karneeva N. Yu., Zhulanov Yu. V., Belov S. V., Pavlikhin G. P., Krasovitskaya K. A. [Investigation of the fraction coefficients of overshooting by a laser aerosol spectrometer (Abstracts of Deposited Papers)]. *Journal of Engineering Physics*. 1981; 41, (3): 548. [<http://www.itmo.by/jepter/CONTE/411981e/conte41.html>].
- Zhulanov Yu. V., Sadovskiy B. F., Petryanov I. V. Potential of optical analysis of aerosol systems. *Doklady Earth Sciences*. 1978; 238. [<http://www.riss.kr/link?id=O19475727>].
- Zhulanov Yu. V., Zagaynov L., Yu S., Nevskiy I. A., Stulov L. D. [Highly dispersed submicron atmospheric aerosols of the arid zone]. *Izvestiya Akademii Nauk SSSR, Fizika Atmosfery i Okeana*. 1986; 22, p. 29–40.
- Zhulanov Yu. V., Mukhin L. M., Nenarokov D. F. Aerosol Counts in Venus Clouds- Preliminary VEGA-1 and VEGA-2 Density Profiles h= 63–47-KM. *Soviet Astronomy Letters*. 1986; 12: 49–52.
- Zhulanov Yu. V., Mukhin L. M., Nenarokov D. F. Structure of the cloud layer in the Venusian atmosphere (the Vega project). *Doklady Earth Sciences*. 1987; 292. [<http://www.riss.kr/link?id=O19482329>] [Zhulanov Yu. V. et al. Structure of the cloud layer in the Venusian atmosphere. *Transactions (Doklady) of the USSR Academy of Sciences: Earth science sections*. 1987; 292(1): 18].
- Zhulanov Yu. V., Mukhin L. M., Nenarokov D. F. Particle-size distributions in the cloud layer of the Venusian atmosphere (the Vega experiment). *Doklady Earth Sciences*. 1987; 295. [<http://www.riss.kr/link?id=O19482543>].
- Zhulanov Yu. V., Mukhin L. M., Nenarokov D. F. Mechanisms generating the cloud layer in the Venusian atmosphere. *Doklady Earth Sciences*. 1987; 295. [<http://www.riss.kr/link?id=O19482547>] [Zhulanov Yu. V., Mukhin L. M., Nenarokov D. F. Mechanisms generating the cloud layer in the Venusian atmosphere. *Transactions (Doklady) of the USSR Academy of Sciences: Earth science sections*. 1988; 295:19].
- Yang L., Liang H., Angelini T. E., Butler J., Coridan R., Tang J. X., Wong G. C. Self-assembled virus-membrane complexes. *Nature materials*. 2004; 3(9): 615.
- Zhao Q., Chen W., Chen Y., Zhang L., Zhang J., Zhang Z. Self-assembled virus-like particles from rotavirus structural protein VP6 for targeted drug delivery. *Bioconjugate chemistry*. 2011; 22(3): 346–352.
- Huang X., Bronstein L. M., Retrum J., Dufort C., Tsvetkova I., Aniagyei S., Stein B., Stucky G., McKenna B., Remmes N., Baxter D., Kao C., Dragnea B. Self-assembled virus-like particles with magnetic cores. *Nano letters*. 2007; 7(8): 2407–2416.
- Donaldson D. J., Tervahattu H., Tuck A. F., Vaida V. Organic aerosols and the origin of life: An hypothesis. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*. 2004; 34 (1–2): 57–67.
- Tervahattu H., Tuck A., Vaida V. Chemistry in prebiotic aerosols: a mechanism for the origin of life. *Cellular Origin and Life in Extreme Habitats and Astrobiology*. 2004; 6: 153–165.
- Targulian V. O., Mergelov N. S., Goryachkin S. V. Soil-like bodies on Mars. *Eurasian soil science*. 2017; 50(2): 185–197.
- Certini G., Scalenghe R., Amundson R. A view of extraterrestrial soils. *European journal of soil science*. 2009; 60(6): 1078–1092.
- McKay C. P., Stoker C. R., Morris J., Conley G., Schwartz D. Space station gas-grain simulation facility: Application to exobiology. *Advances in Space Research*. 1986; 6(12): 195–206.
- Coll P., Coscia D., Smith N., Gazeau M. C., Ramirez S. I., Cernogora G., Israel G., Raulin F. Experimental laboratory simulation of Titan's atmosphere: aerosols and gas phase. *Planetary and Space Science*. 1999; 47(10–11): 1331–1340.