

# Исследование активности L-лизин- $\alpha$ -оксидазы в опытах *in vitro* на моделях вирусов Синдбис, клещевого энцефалита, Западного Нила, Тягиня и Дхори

И. П. СМЕРНОВА<sup>1</sup>, В. Ф. ЛАРИЧЕВ<sup>2</sup>, Ю. А. ШНЕЙДЕР<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Российский университет дружбы народов, Москва

<sup>2</sup> Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва  
Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского Минздрава России, Москва

## L-Lysine- $\alpha$ -Oxidase *in vitro* Activity in Experiments on Models of Viruses Sindbis, Forest-Spring Encephalitis, Western Nile, Tyaginya and Dhori

I. P. SMIRNOVA, V. F. LARICHEV, YU. A. SHNEIDER

Russian University of Peoples' Friendship, Moscow

N. F. Gamaleya Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow

D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Moscow

Впервые исследовалось влияние противоопухолевой препарата L-лизин- $\alpha$ -оксидазы, полученного из культуральной жидкости *Trichoderma harzianum* Rifai F-180. В опытах *in vitro* установлена высокая активность L-лизин- $\alpha$ -оксидазы на модели вируса клещевого энцефалита и отсутствие активности в отношении вирусов Синдбис, Западного Нила, Тягиня и Дхори.

**Ключевые слова:** L-лизин- $\alpha$ -оксидаза, арбовирусы, клещевой энцефалит, цитопатическое действие, противовирусная активность.

The antitumor effect of L-lysine- $\alpha$ -oxidase from the culture fluid of *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 was investigated for the first time. The *in vitro* studies revealed its high activity on a model of the forest-spring encephalitis virus and no activity against the Sindbis, Western Nile, Tyaginya and Dhori viruses.

**Key words:** L-lysine- $\alpha$ -oxidase, arboviruses, forest-spring encephalitis, cytopathic effect, antiviral activity.

Арбовирусы — это экологическая группа вирусов, передающихся восприимчивым позвоночным через укусы кровососущих членистоногих: комаров, клещей, москитов, мошек и мокрецов.

Такие инфекции, как лихорадка Чикунгунья и О'Ньонг-Ньонг, восточный, западный, венесуэльский энцефалиты лошадей (сем. *Togaviridae*), лихорадка денге, жёлтая лихорадка, энцефалиты — японский, клещевой, Сент-Луис, долины Муррея, Западного Нила (сем. *Flaviviridae*), Крымской-Конго геморрагической лихорадки, лихорадки Долины Рифт (сем. *Bunyaviridae*), а также вирусы других семейств (*Reoviridae*, *Arenaviridae* и *Rhabdoviridae*) — далеко не полный перечень опасных для человека арбовирусных инфекций, имеющих огромное значение для здравоохранения.

Для подавляющего большинства арбовирусных инфекций вакцинные препараты не разработаны. В связи с этим химиопрепараты приобрета-

ют решающее значение как для лечения, так и для профилактики.

В основу изучения противовирусного действия препаратов положен таксономический принцип (если препарат действует на один «модельный» вирус, то можно предположить, что он будет действовать на все вирусы данного семейства, так как стратегия генома у всего семейства одинакова).

Большая часть исследований, касающаяся химиотерапии арбовирусных инфекций, посвящена изучению ингибирующей роли противовирусных препаратов на моделях бунья- и аренавирусных инфекций. Весьма обнадеживающими были данные о выраженной противовирусной активности рибавирина в отношении тога-, бунья- и аренавирусных инфекций и о перспективности этого препарата для клинического применения [1].

На кафедре биохимии им. академика Т. Т. Берёзова Российского университета дружбы народов в течение многих лет проводятся исследования Л-лизин- $\alpha$ -оксидазы — противовирусного и противоопухолевого фермента из *Trichoderma harzianum* Rifai F-180. Фермент

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6.  
РУДН

**Схема эксперимента Определение активности L-лизин- $\alpha$ -оксидазы на перевиваемых линиях клеток**

Ряды	L-лизин- $\alpha$ -оксидаза, 25 мкг/мл				L-лизин- $\alpha$ -оксидаза 12,5 мкг/мл				Поддерживающая среда без L-лизин- $\alpha$ -оксидазы			
	1**	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
*А	-2***	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2
В	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3
С	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4
Д	-5	-5	-5	-5	-5	-5	-5	-5	-5	-5	-5	-5
Е	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6
Ф	-7	-7	-7	-7	-7	-7	-7	-7	-7	-7	-7	-7
Г	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8
Н	Контроль токсичности				Контроль токсичности				Контроль клеток			

**Примечание.** \* – Номера горизонтальных рядов на 96-луночном планшете; \*\* – номера вертикальных рядов на 96-луночном планшете; \*\*\* – степень ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ...) разведения исследуемого вируса.

L-лизин- $\alpha$ -оксидаза является ингибитором вируса простого герпеса 1-го типа, вируса иммунодефицита человека и ряда других особо опасных вирусов [2–10].

Цель данной работы – исследование возможности ингибирования гомогенного фермента L-лизин- $\alpha$ -оксидазой вирусов из семейств *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* и *Orthomyxoviridae*.

### Материал и методы

В работе использованы вирусы из коллекции лаборатории биологии и индикации арбовирусов «НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского»: семейство *Togaviridae*, род *Alfavirus* – вирус Синдбис (штамм 574); семейство *Flaviviridae*, род *Flavivirus* – вирус клещевого энцефалита (штамм 205), вирус Западного Нила (штамм Аст.986); семейство *Bunyaviridae*, род *Bunyavirus* – вирус Тягиня (штамм 92); семейство *Orthomyxoviridae*, род *Thogotovirus* – вирус Дхори (прототипный штамм).

Перевиваемые линии клеток: клетки почки эмбриона свиньи (SPEV) и клетки почки эмбриона зелёной мартышки (Vero, клон Е6). Клетки SPEV выращивали в 96-луночных планшетах («Corning», США) на питательной среде 199 (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН) с 5% эмбриональной телячьей сыворотки («High Clone», США). Клетки Vero Е6 выращивали в 96-луночных планшетах на питательной среде Игла с двойным набором аминокислот (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН) с 5% эмбриональной телячьей сыворотки («High Clone», США).

Источником заражения клеток служили вирусосодержащие суспензии мозговой ткани инфицированных новорождённых белых мышей. Для приготовления разведений мозговой ткани и препаратов использовалась питательная среда с 1% эмбриональной телячьей сывороткой («High Clone», США). Готовили 10% мозговую суспензию, а затем – последовательные десятикратные разведения вирусосодержащего материала от  $10^{-2}$  до  $10^{-10}$ .

Учёт реакций проводили ежедневно в течение 7 дней, наблюдая за развитием цитопатического действия (ЦПД) (гибель клеток) вирусов на клетки, просматривая лунки планшетов под инвертированным микроскопом. Титр вируса оценивали в  $\lg$  ЦПД<sub>100</sub> (развитие ЦПД во всех лунках с одинаковым разведением вируса).

Схема эксперимента (таблица): 10-кратные разведения вирусов от  $10^{-2}$  до  $10^{-8}$  или от  $10^{-4}$  до  $10^{-10}$  (в зависимости от активности предварительно «протитрованных» вирусных суспензий) последовательно, начиная с верхнего горизонтального ряда (А), вносили по 100 мкл в лунки 96-луночных планшетов с монослоем клеток. В ряд (Н) вносили поддерживающую среду без

вируса. Контакт вируса с клетками проводили в течение 1 ч при 37°C. После инкубации вирусосодержащую среду удаляли из планшета. В лунки с контрольным (сравнительным) титрованием – 4 вертикальных ряда (№ 9–12) – вносили поддерживающую среду, а в лунки, предназначенные для определения противовирусной активности, добавляли поддерживающую среду, содержащую L-лизин- $\alpha$ -оксидазу: 4 вертикальных ряда (№ 1–4) в концентрации 25 мкг/мл и 4 вертикальных ряда (№ 5–8) – 12,5 мкг/мл.

В работе использовали фермент L-лизин- $\alpha$ -оксидазу из *Trichoderma harzianum* Rifai F-180. Гомогенный фермент получали по ранее разработанной методике [4, 5].

Активность L-лизин- $\alpha$ -оксидазы в культуральной жидкости *Trichoderma* рассчитывали по приросту  $H_2O_2$ , количество которой определяли спектрофотометрическим ортодиазидиновым методом [5].

### Результаты и обсуждение

На первом этапе эксперимента оценивалось токсическое действие L-лизин- $\alpha$ -оксидазы на перевиваемые линии клеток. К монослою клеток в лунках планшетов добавляли L-лизин- $\alpha$ -оксидазу в концентрациях 2,0, 1,0, 0,5, 0,25, 0,1, 0,05, 0,025, 0,012, 0,006, 0,003, 0,0012, 0,0006 мг/мл. Токсический эффект препарата оценивали по развитию ЦПД. Было установлено, что в обеих линиях клеток выраженный токсический эффект развивается в концентрациях 0,05 мг/мл и выше. Концентрации 0,025 мг/мл и 0,0125 мг/мл (25 и 12,5 мкг/мл) являются максимально допустимыми, хотя и вызывают тормозящее действие на размножение клеток. Для изучения противовирусного действия препарата были выбраны максимальные его концентрации, не вызывающие ЦПД.

Изучение противовирусного действия L-лизин- $\alpha$ -оксидазы на вирусы Западного Нила, Тягиня, Синдбис и Дхори проводились на клетках Vero Е6.

В ходе эксперимента установлено, что титр вируса Западного Нила при контрольном титровании составил 9,0  $\lg$  ЦПД<sub>100</sub>, а с L-лизин- $\alpha$ -оксидазой как в концентрации 25 мкг/мл, так и 12,5 мкг/мл составил те же 9,0  $\lg$  ЦПД<sub>100</sub>. Титр вируса Тягиня в контроле составил 7,0  $\lg$  ЦПД<sub>100</sub>, с L-лизин- $\alpha$ -оксидазой в концентрации 25 мкг/мл – 8,0

Ig ЦПД<sub>100</sub>, в концентрации 12,5 мкг/мл — 7,0 Ig ЦПД<sub>100</sub>. Титр вируса Синдбис в контроле составил 6,5 Ig ЦПД<sub>100</sub>, а с L-лизин- $\alpha$ -оксидазой как в концентрации 25 мкг/мл, так и 12,5 мкг/мл составил 7,0 Ig ЦПД<sub>100</sub>. Для вируса Дхори установлено, что титр в контроле составил 7,0 Ig ЦПД<sub>100</sub>, а с L-лизин- $\alpha$ -оксидазой в концентрациях 25 мкг/мл и 12,5 мкг/мл — 7,0 Ig ЦПД<sub>100</sub>.

L-лизин- $\alpha$ -оксидаза не оказывает какого-либо противовирусного действия на вирусы Западного Нила, Тягиня, Синдбис и Дхори, так как не выявлено разницы в титрах вирусов при их титровании с препаратом и без.

Опыты по определению активности L-лизин- $\alpha$ -оксидазы относительно вируса клещевого энцефалита (КЭ) проводились на линии клеток SPEV, так как именно в них развивается ЦПД, вызываемое вирусом КЭ.

Было установлено, что титр вируса в контроле составил 8,0 Ig ЦПД<sub>100</sub>, а с L-лизин- $\alpha$ -оксидазой как в концентрации 25 мкг/мл, так и 12,5 мкг/мл составил 5,0 Ig ЦПД<sub>100</sub>. L-лизин- $\alpha$ -оксидаза оказывает выраженное противовирусное действие (индекс нейтрализации — 3,0 Ig ЦПД<sub>100</sub>).

Отрицательные результаты эксперимента с другими вирусами оказались неожиданными,

особенно с вирусом Западного Нила, который относится к тому же семейству, что и вирус КЭ (*Flaviviridae*). Однако эксперимент с вирусом КЭ проводился на клетках SPEV, а с остальными вирусами на клетках Vero E6. Возможно, противовирусное действие связано с особенностями клеточных линий. В то же время эксперименты по изучению действия рибавирина на вирусы Тягиня и Дхори, проводившиеся на клетках Vero E6, показали его способность подавлять репликацию этих вирусов [11]. А эксперименты по изучению противовирусной активности рибавирина на клетках SPEV относительно КЭ — отрицательные.

## Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований в опытах *in vitro* на модели вируса клещевого энцефалита на сегодняшний день, L-лизин- $\alpha$ -оксидаза — первое вещество, которое ингибирует ЦПД вируса КЭ на перевиваемой линии клеток. Механизм ее противовирусного действия не известен. Нами обнаружено отсутствие активности фермента в отношении вирусов Синдбис, Западного Нила, Тягиня и Дхори.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Березина Л.К. Химиопрофилактика и химиотерапия / Арбовирусы и арбовирусные инфекции / Под ред. Д.К.Львова, С.М.Клименко, С.Я.Гайдамович. М.: Медицина, 1989; 156—163.
2. Алексеев С.Б., Березов Т.Т., Анджапаридзе О.Г. и другие. Ингибитор вируса герпеса простого I-го типа. Патент РФ №2022012, 1994.
3. Алексеев С.Б., Веса В.С., Смирнова И.П. и другие. Ингибитор вируса иммунодефицита человека. Патент РФ № 2022011, 1994.
4. Смирнова И.П., Берёзов Т.Т. Биотехнология фермента L-лизин- $\alpha$ -оксидазы из триходермы. М.: Изд.-во «Копиризо». М.: 189.
5. Смирнова И.П., Шкинев В.М., Руднев А.В., Шнейдер Ю.А., Кузовников А.Е. Технологии выделения и очистки L-лизин- $\alpha$ -оксидазы. Журн Биотехнология 2010; 6: 47—54.
6. Смирнова И.П., Шнейдер Ю.А. Штамм — *Trichoderma harzianum* Rifai — продуцент ингибитора вируса кольцевой пятнистости табака (Tobacco ringspot virus). Патент № 2475528, (Р.Ф; Изобретение), Бюллетень Роспатента «Изобретения, полезные модели» № 5, 20.02.2013г.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Смирнова Ирина Павловна — Кафедра биохимии РУДН, Москва.

7. Смирнова И.П., Шнейдер Ю.А. Продуцент ингибитора вируса некритической пятнистости бальзамина. Патент № 2481392 (Р.Ф; Изобретение), Бюллетень Роспатента «Изобретения, полезные модели» № 13, 10.05.2013 г.
8. Смирнова И.П., Ларичев В.Ф. Ингибитор вируса клещевого энцефалита. Патент № 2473689 (Р.Ф; Изобретение), Бюллетень Роспатента «Изобретения, полезные модели» № 3, 27.01.2013 г.
9. Сёмкина О.А., Смирнова И.П., Давахян М.А., Бондаренко О.В. Кишмахова Л.М. Разработка состава и технологического геля ранозаживляющего действия. Вестник РУДН, Медицина, 2013; 4: 79—87.
10. Smirnova I.P., Kuznetsova O.M., Ivanova-Radkevich V.I., Orlova V.S., Podboronov V.M., Alexeev A.A. Testing of an antitumor enzyme L-lysine- $\alpha$ -oxidase from *Trichoderma harzianum* Rifai F-180. World J Med Sci 2014; 11: 2: 233—236.
11. Белов А. В., Ларичев В. Ф., Галкина И. А., Хуторецкая Н. В., Бутенко А. М., Константинова И. Д., Музыка И. С., Галегов Г. А. Активность отечественного рибавирина в опытах *in vitro* на моделях вирусов крымской геморрагической лихорадки, лихорадки долины Рифт, Тягиня и Дхори. Вopr вирусол 2008; 1: 34—36.

Шнейдер Юрий Андреевич — Кафедра биохимии РУДН, Москва.