

## ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ВОДОРАСТВОРИМЫХ МЕТАБОЛИТОВ ШТАММА БАКТЕРИИ *AEROMONAS BESTIARUM* Bp-1010

Пучкова Л. И., Макаревич Е. В., Ибрагимова Ж. Б., Селиванова М. А.,  
Соловьянова Н. А., Мазуркова Н. А., Андреева И. С.

*Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии (ГНЦ ВБ) «Вектор», п. Кольцово Новосибирской области, Россия, e-mail: puchkova@vector.nsc.ru*

Из образцов донных осадков озера Байкал методом скрининга на селективных средах отобран штамм бактерии, обладающий высокой нуклеазной активностью. Для анализа использовали метод высева на плотные среды, содержащие ДНК и метод электрофореза в агарозном геле с использованием в качестве субстратов фаговые ДНК и РНК. Выделенный штамм идентифицирован как *Aeromonas bestiarum* Bp-1010. Бактерия содержит метаболиты, обладающие противовирусной активностью в профилактической схеме в культуре клеток MDCK относительно вируса гриппа: A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и A/Aichi/2/68(H3N2) (индексы нейтрализации *in vitro* составили 2,5–6,0 и 2,4–5,0 lg соответственно). Метаболиты штамма *Aeromonas bestiarum* Bp-1010 также подавляют репродукцию вируса оспы мышей и вируса простого герпеса 2-го типа в культуре клеток Vero в профилактической схеме. Индексы нейтрализации репродукции вируса простого герпеса 2-го типа и вируса оспы мышей в культуре клеток Vero под действием метаболитов составили 2,0 и 2,9 lg соответственно. Штамм *Aeromonas bestiarum* Bp-1010 может быть использован для разработки на его основе лекарственных форм препаратов для лечения и профилактики вирусных заболеваний.

Ключевые слова: *Aeromonas bestiarum*, РНКазы, нуклеазы, вирус гриппа субтипов H5N1 и H3N2, вирус оспы мышей, вирус простого герпеса 2-го типа, культуры клеток MDCK и Vero.

## ANTIVIRAL ACTIVITY OF WATER-SOLUBLE METABOLITES OF STRAIN *AEROMONAS BESTIARUM* Bp-1010

Puchkova L. I., Makarevich E. V., Ibragimova J. B., Selivanova M. A.,  
Solovyayanova N. A., Mazurkova N. A., Andreeva I. S.

*Federal Budgetary Research Institution "State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk region, Russia, e-mail: puchkova@vector.nsc.ru*

Strain with high nuclease activity was selected from the samples of bottom sediments of lake Baikal used screening method for selective media. The method of seeding in a dense medium containing DNA and a method of electrophoresis in agarose gel as substrates phage DNA and RNA was using for the analysis. The selected strain was identified as *Aeromonas bestiarum* Bp-1010. The bacterium contains metabolites with antiviral activity in the prevention scheme in cell culture MDCK regarding the avian influenza virus A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) virus and the virus of human influenza A/Aichi/2/68(H3N2) (indices *in vitro* neutralization was 2.5 to 6.0 and 2.4 and 5.0 lg, respectively). The metabolites of strain *Aeromonas bestiarum* Bp-1010 also inhibit the replication of the virus of smallpox mice and herpes simplex virus 2 type in the culture of Vero cells in preventive scheme. Indexes neutralize the reproduction of herpes simplex virus 2-type and virus of smallpox mice in the culture of Vero cells under the action of metabolites was 2.0 and 2.9 lg, respectively. Strain *Aeromonas bestiarum* Bp-1010 can be used for development on its basis of dosage forms of drugs for the treatment and prevention of viral diseases.

Keywords: *Aeromonas bestiarum*, RNase, nucleases, influenza virus subtypes H5N1 and H3N2, smallpox virus in mice, herpes simplex virus type 2, cell culture MDCK and Vero.

Микроорганизмы представляют собой большой потенциал для поиска продуцентов антивирусных агентов. Литературные данные свидетельствуют о способности микроорганизмов, относящихся к различным таксономическим группам, ингибировать развитие вирусов. Наличие у бактерий и грибов разнообразных механизмов воздействия на вирусы дает возможность разрабатывать препараты на комплексной основе, влияющие на

различные этапы репродукции вирусов [10]. Вирус гриппа является самым известным и распространенным среди вирусов, обуславливающих инфекционные заболевания верхних дыхательных путей. В настоящее время циркулируют два основных субтипа вируса гриппа типа А: H1N1 и H3N2 и тип В, вызывающие ежегодные эпидемии гриппа. Вирус гриппа часто мутирует, в результате чего имеющиеся препараты становятся не эффективными. Это связано с возникновением мутаций, приводящих к появлению резистентности вируса гриппа к противовирусным препаратам, таким как ремантадин, озельтамивир и ряду других. [3, 10]. В сложившейся ситуации вопрос о необходимости разработки и поиска новых средств защиты от гриппозной инфекции, включающих как профилактические, так и лечебные препараты, представляется крайне важным и особо актуальным. В этом плане представляет интерес изучение ферментов нуклеинового обмена грибов и бактерий, отдельные виды которых секретируют значительное количество нуклеаз – ферментов, деполимеризующих нуклеиновые кислоты. Они находят широкое применение в практическом использовании в качестве лечебных и профилактических препаратов, в противовирусной терапии и при лечении онкологических заболеваний [1, 2, 4, 5].

Основным источником этих ферментов являются почвенные бактерии, грибы и дрожжи. Скрининг микроорганизмов, продуцентов секретируемых нуклеаз, позволил установить, что наиболее активными продуцентами РНКаз среди бактерий являются представители рода *Bacillus*, нуклеазы, обладающие РНКазной и ДНКазной активностями, продуцируют бактерии родов *Staphylococcus* и *Serratia* [1]. Результаты испытаний противовирусных свойств нуклеаз, проведенных рядом авторов, показали, что эти ферменты могут стать одним из достаточно эффективных средств профилактики и лечения различных вирусных заболеваний человека и животных. Показано, что рибонуклеазы обладают выраженной противовирусной активностью в отношении таких РНК-содержащих вирусов, как вирус гриппа, полиомиелита, клещевого энцефалита, бешенства [2, 4–6]. Обнаружение РНКаз и ДНКаз с новыми свойствами позволит создать препараты, расширяющие диапазон действия имеющихся в настоящее время противовирусных средств.

Целью данной работы является изучение свойств и оценка противовирусной активности водных экстрактов нового штамма бактерии *Aeromonas bestiarum* ВР-1010.

### **Материалы и методы**

В качестве продуцента противовирусных соединений использовали бактериальный штамм *Aeromonas bestiarum* ВР-1010, выделенный нами ранее из донных осадков озера Байкал, депонированный в «Коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»» под № В-1270. При его культивировании применяли следующие питательные среды: рыбный питательный агар (РПА, Оболенск, Россия), среду S, содержащую (г/л):

пептон («Difco», США) - 16,0; NaCl - 5,0; MgCl<sub>2</sub> - 0,1; Трис - 6,05; pH 8,0; жидкую (LB) и агаризованную (LA) среды pH 7, 2 («Difco», США),

В качестве вирусных агентов использовали РНК-содержащий вирус: гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2) и гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1); ДНК-содержащие вирусы: ортопоксвирусы – вирус осповакцины (ВОВ, штамм Л-ИВП) и вирус оспы мышей (ВОМ, штамм К-1), а также вирус простого герпеса 2-го типа (ВПГ-2, штамм MS), полученные из Коллекции микроорганизмов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Для определения наличия нуклеаз (Н) биомассу отдельных колоний суспендировали в 150–200 мкл дистиллированной воды или TEN буфера (0,1 М Трис - pH 7,5; 0,01 М ЕДТА; 0,05 М NaCl). Бактериальные клетки лизировали лизоцимом (0,5 мг/мл) с добавлением тритона X-100 (0,1 %) или ультразвуком на дезинтеграторе MSE (Англия). Аликвоты клеточного экстракта (КЭ) в количестве 1-2 мкл вносили в реакционную смесь (W), содержащую 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,5; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT и 1 мкг субстратной ДНК фагов λ или T7 или РНК фага MS2. Все субстраты производства фирмы СибЭнзим (Новосибирск). Продукты реакции подвергали электрофорезу в 0.8 %-ном агарозном геле («Sigma», США). О наличии нуклеаз в штаммах микроорганизмов и их активности судили по исчезновению полосы субстратной ДНК на картине электрофореграммы в УФ-свете, а также по отсутствию следов РНК в геле [8, 9].

Количественную оценку нуклеазной активности проводили по превращению субстратных нуклеиновых кислот во фрагменты, растворимые в 4-х %-ной HClO<sub>4</sub>, с появлением кислоторастворимого материала с абсорбцией при D<sub>260</sub> нм. [7]. За единицу нуклеазной активности (Е) принимали количество фермента, вызывающего увеличение адсорбции на 1,0 оптическую единицу при D<sub>260</sub> нм за 20 мин при 37 °С.

Удельную активность измеряли в Е/мг белка. Концентрацию белка в образцах определяли по формуле:  $C \text{ мг/мл} = (D_{228,5} - D_{234,5}) : 3 \times n$ , где D-оптическая плотность, n-разведение образца.

Для приготовления образцов препаратов использовали бактериальные клетки, наработанные в среде LB или среде S с использованием термостатированной качалки (КТ-104, Россия, 180 об./мин, 30 °С). Для получения клеточных экстрактов (КЭ) влажную биомассу в количестве 1 г подвергали разрушению в 4-х мл дистиллированной воды на ультразвуковом дезинтеграторе MSE при 4-5 °С, контролируя на спектрофотометре падение величины D<sub>560</sub> до уменьшения оптической плотности суспензии на 80–90 % от исходной. Суспензию клеток освобождали от клеточных остатков центрифугированием (10 тыс. об./мин, 20 мин, при температуре 4–5 °С). Далее полученные образцы исследовали на противовирусную активность *in vitro*.

Для тестирования цитотоксичности и противовирусной активности образцов относительно вируса гриппа использовали перевиваемую культуру клеток MDCK. Клеточную суспензию доводили до посевной концентрации  $1,0-1,5 \times 10^5$  кл./мл средой RPMI-1640 (ООО «Биолот», С-Петербург), содержащей 10 % сыворотки крови плодов коровы («Gibco», США) и вносили по 100 мкл/лунку 96-луночного планшета. Планшеты с клетками помещали в термостат на 2–3 суток при температуре 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub> и 100 % влажности до образования монослоя. Для тестирования токсичности и противовирусной эффективности бактериальных метаболитов относительно вирусов BOB, BOM и ВПГ-2 в аналогичных условиях инкубировали перевиваемую культуру клеток Vero. Культуры клеток MDCK и Vero были получены из Коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Для определения токсических доз метаболитов образцы разводили в 2, 5, 10, 20 раз средой RPMI-1640 или DMEM (ООО «Биолот», С-Петербург) и вносили по 100 мкл в соответствующие лунки планшета с клетками MDCK или Vero, соответственно и в течение 2-х суток инкубировали в термостате при температуре 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub> и 100 % влажности. Затем с помощью инвертированного микроскопа оценивали наличие токсического действия в монослоях клеток, инкубированных с разными концентрациями образцов. Для определения противовирусной активности использовали максимально переносимые концентрации образцов для клеток MDCK и Vero. Готовили разведения вируссодержащей жидкости от 1 до 8 с десятикратным шагом с использованием среды RPMI-1640, содержащей 2 мкг/мл трипсина ТРСК («Sigma», США), или среды DMEM. Исследование противовирусной активности образцов проводили по профилактической схеме: сначала на культуру клеток вносится образец и затем вирус.

Для определения противовирусной активности образцов в монослой культур клеток вносили по 50 мкл/лунку выбранного разведения образца, через 1 ч инкубации при температуре 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub> и 100 % влажности вносили по 50 мкл/лунку разведений вирусалантоисной жидкости (ВАЖ) от 1 до 8. Клетки инкубировали в течение 2-х суток для вируса гриппа и 3-х суток для ДНК-содержащих вирусов при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> в термостате ТС-1/80 СПУ (Россия). Затем в каждой лунке с помощью инвертированного микроскопа регистрировали цитопатическое действие (ЦПД) в монослое клеток и определяли титр вируса. Дополнительно наличие вируса гриппа в среде культивирования тестировали по реакции гемагглютинации (РГА) с 1 % эритроцитами петуха. Определяли титры инфекционных вирусов в клетках в Ig ТЦД<sub>50</sub>/мл в опыте и контроле (ИД<sub>50</sub> in vitro с образцом и без него), а затем высчитывали индексы нейтрализации (ИН) вирусов под влиянием образцов.

## Результаты и обсуждение

Методом скрининга на селективных средах с добавлением ДНК и РНК отобраны бактериальные изоляты, обладающие нуклеазной активностью, которые затем были проанализированы на наличие нуклеаз методом электрофореза в агарозе. В результате анализа выяснено, что изолят Вр-1010 обладает наиболее высокой РНКазной активностью, по сравнению с другими изолятами. Средняя удельная РНКазной активность бактериального штамма составила 110,0 Е/мг белка. В соответствии с выявленными фенотипическими признаками и по результатам молекулярно генетического анализа (сходство по фрагментам последовательностей 16S рРНК с имеющимися в GenBank на уровне 99 %) эта бактерия была отнесена к виду *Aeromonas bestiarum*.

В процессе работы было показано, что основная нуклеазная активность (РНКазная и ДНКазная) штамма бактерии *A. bestiarum* Вр-1010 содержится в клеточной биомассе и в меньшей степени в культуральной жидкости (КЖ). В дальнейшем для исследования его противовирусной активности использовали клеточные экстракты (КЭ), полученные после разрушения биомассы ультразвуком. Оптимальные условия работы ферментов, гидролизующих РНК, определяли при 3-х значениях рН: 6,0, 7,0 и 8,5. Максимальный уровень активности метаболитов КЭ наблюдали в буфере W при рН 8,5. При анализе отдельных колоний штамма *A. bestiarum* Вр-1010 был выделен клон, с активностью РНКазы в культуральной жидкости (КЖ) – 178,2 ед./мл, а в клеточном экстракте 732,6 ед./мл, (использована среда S, культивирование в течение 24 ч, при температуре 30 °С).

Определение противовирусной активности водорастворимых метаболитов КЭ штамма *A. bestiarum* Вр-1010 по отношению к вирусу гриппа показало, что КЭ данного штамма при профилактической схеме введения вызывает в культуре клеток MDCK выраженное ингибирование репродукции вируса гриппа субтипа А/Н3N2 и практически полное ингибирование репродукции вируса гриппа субтипа А/Н5N1 (табл. 1).

**Таблица 1**

Противовирусная активность клеточного экстракта штамма *A. bestiarum* Вр-1010 в культуре клеток MDCK относительно вируса гриппа разных субтипов

Вирус гриппа	№№ экстракта	Титр вируса гриппа (lg ТЦД <sub>50</sub> /мл):		Индекс нейтрализации вируса (ИН), lg под действием экстракта клеток
		в присутствии экстракта	без экстракта (контроль)	
A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1)	1	0	2,5±0,10	2,5
	2	0,5±0,07	6,5±0,10	6,0
A/Aichi/2/68	1	0,1	2,5±0,05	2,4

(H3N2)	2	1,5±0,13	6,5±0,20	5,0
--------	---	----------	----------	-----

Примечание: эксперименты проведены в трех повторностях.

Полученные данные свидетельствуют о способности метаболитов штамма *A. bestiarum* Вр-1010 к ингибированию репродукции вируса гриппа субтипов А/Н3N2 и А/Н5N1 на культуре клеток MDCK в профилактической схеме анализа.

Определение противовирусных свойств образцов КЭ в отношении ортопоксвирусов и вируса простого герпеса 2-го типа проводили на клетках Vero (табл. 2). Для проведения испытаний использовали образцы КЭ с РНКазной активностью не менее 492,8 Е/мл и ДНКазной активностью не менее 50,6 Е/мл. Исследованные образцы имели низкую токсичность для клеток Vero. Средние данные по трем повторностям опыта представлены в таблице 2.

**Таблица 2**

Противовирусная активность клеточного экстракта штамма *A. bestiarum* Вр-1010 в культуре клеток Vero в отношении ДНК-содержащих вирусов

Вирус	Титр вируса (lg ТЦД <sub>50</sub> /мл):		Индекс нейтрализации вируса (ИН), lg под действием экстракта клеток
	в присутствии экстракта	без экстракта (контроль)	
ВОМ	1,7±0,13	4,6±0,10	2,9
ВПГ-2	3,3±0,16	5,3±0,08	2,0
ВО	3,3±0,11	4,5±0,12	1,2

Образцы КЭ штамма *A. bestiarum* Вр-1010 проявили незначительное противовирусное действие в отношении ВО (ИН -1,2 lg), но были активны в отношении вирусов ВПГ-2 и ВОМ (табл. 2). Индексы нейтрализации репродукции вируса простого герпеса 2-го типа и вируса оспы мышей в культуре клеток Vero под действием исследуемого КЭ составили 2,0 и 2,9 lg соответственно.

**Заключение.** В процессе анализа ряда микроорганизмов на наличие нуклеаз был выявлен штамм бактерии *Aeromonas bestiarum* Вр-1010 со средней удельной РНКазной активностью 110,0 Е/мг белка. Показана противовирусная активность данного штамма в профилактической схеме в отношении РНК-содержащего вируса гриппа разных подтипов: А/Aichi/2/68 (H3N2) и А/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1), а также ДНК-содержащих: вируса оспы мышей и вируса простого герпеса 2-го типа. Важно отметить, что при наличии эффективного противовирусного действия исследованный бактериальный штамм обладает незначительной токсичностью относительно клеток MDCK и Vero.

Полученные результаты позволяют считать штамм *A. bestiarum* Вр-1010 перспективным в целях разработки препаратов широкого спектра действия для профилактики и лечения вирусных заболеваний.

Наличие в исследуемых бактериальных препаратах активности против РНК- и ДНК-содержащих вирусов позволяет предположить наличие среди продуцируемых метаболитов не только РНКаз, но и ДНКаз либо неспецифичной к углеводному остатку нуклеазы, способной к гидролизу как РНК, так и ДНК.

### Список литературы

1. Аликин Ю. С., Масычева В. И., Клименко В. П. Эндоглиюкин – препарат против вирусных заболеваний // Пчеловодство. – 1996. – № 4. – С. 17-19.
2. Грибенча С. В., Поцелуева Л. А., Баринский И. Ф., Деев С. М., Баландин Т. Г., Лещинская И. Б. Защитная активность РНКазы *Bacillus intermedius* у морских свинок и кроликов, зараженных уличным вирусом бешенства // Вопросы вирусологии. – 2006. – Т. 5. – С. 41–43.
3. Грипп: Руководство для врачей / Под ред. Г. И. Карпухина. – СПб., 2001. – 360 с.
4. Королева Л. С., Свищева Н. С., Буракова Е.А., Грибкова Н. В., Шмелева Н. П., Рустамова Л. М., Сабынин В. М., Сильников В. Н. Синтез и противогриппозная активность искусственных рибонуклеаз // Химикофармацевтический журнал. – 2010. – Т. 44. – № 12. – С. 31-34.
5. Куриненко Б. М., Алексеева И. И., Ильинская О. Н. Способ использования рибонуклеазы *Bacillus intermedius* // Патент России № 2509801. 2014. Бюл. № 8.
6. Лещинская И. Б., Варламов В. П., Куриненко Б. М. Нуклеазы бактерий. – Казань.: Изд-во КГУ, 1991. – 231 с.
7. Лещинская И. Б., Балабан Н. П., Капранова М. Н., Голубенко И. А. Методы определения активности нуклеаз и родственных ферментов. Современные методы изучения нуклеиновых кислот и нуклеаз микроорганизмов. – 1980. – С. 53-60.
8. Пучкова Л. И., Калмыкова Г. В., Бурцева Л. И., Репин В. Е. Энтомопатогенные бактерии *Bacillus thuringiensis*-продуценты эндонуклеаз рестрикции // Прикл. биохимия и микробиология. – 2002. – Т. 38. – С. 140 – 144.
9. Пучкова Л. И., Ушакова Т. А., Михайлова В. К., Репин В. Е. Тестирование и выделение высокоочищенных эндонуклеаз рестрикции // Прикл. биохимия и микробиология. – 2002. – Т. 38. – С. 20–24. Чижов Н.П. // Вопросы вирусологии. – 1974. – Т. 6. – С. 647-652.

10. Li K.S., Guan Y., Wang J. et al. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia // Nature. – 2004. – V. 430. – P. 209 –213.

**Рецензенты:**

Теплякова Т. В., д.б.н., профессор, заведующая лабораторией микологии отдела биофизики и экологических исследований Федерального бюджетного учреждения науки Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Роспотребнадзора РФ), пос. Кольцово;

Лебедев Л. Р., д.м.н., заведующий лабораторией нуклеиновых кислот и рекомбинантных белков Института медицинской биотехнологии Федерального бюджетного учреждения науки Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Роспотребнадзора РФ), г. Бердск.