

ВЛИЯНИЕ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ НА РЕПРОДУКЦИЮ ВИРУСА ГЕРПЕСА ПРОСТОГО ПЕРВОГО ТИПА *IN VITRO*.

И.П. СМЕРНОВА, С.В. ДИОРДИЦА, С.Б. АЛЕКСЕЕВ, И.З. ЗАЙЦЕВ.

Кафедра биохимии Российского Университета дружбы народов

L-лизин- α -оксидаза (ЛО) - фермент грибного происхождения, катализирующий окислительное дезаминирование L-лизина, был использован для ингибирования репродукции вируса герпеса простого первого типа (HSV-1). Антивирусная активность ЛО была тестирована *in vitro*. Экспрессию вирусных антигенов и цитопатическое действие HSV-1 ЛО тормозит полностью уже при концентрации 0,7 мкг/мл.

Ключевые слова: L-лизин- α -оксидаза, репродукция, вирус герпеса.

ВВЕДЕНИЕ. В литературе имеется достаточное количество сведений, указывающих на перспективность использования ферментов из микроорганизмов в качестве медицинских препаратов [1,2].

В настоящее время имеется достаточно доказательств перспективности использования L-лизин- α -оксидазы (ЛО) из *Trichoderma sp.* в качестве противоопухолевого фермента [3-6], росттормозящий эффект которого, был показан Kusakabe et al в 1979 г [7]. Поскольку вирусы группы герпеса являются этиологическим фактором возникновения опухолей в организме человека, представляло интерес изучить антигерпетическую активность ЛО.

В представленной работе было проведено изучение влияния ЛО на репродукцию вируса герпеса простого первого типа (ВГП-1) в культуре клеток *Vero*.

МЕТОДИКА. В работе использовали гомогенный препарат фермента ЛО из *Trichoderma sp.* с удельной активностью 142 Е/мг.

ВГП-1 (штамм HF) пассировали на перевиваемой культуре клеток *Vero* почек зеленой мартышки.

Монослойные культуры клеток *Vero* выращивали на среде Игла с добавлением 10% сыворотки крови телят в культуральных планшетах фирмы Nunclon при температуре 37° С. После того, как клетки достигали 80% сплошного монослоя (через 48 часов роста) их заражали ВГП-1 со множественностью 1, 10 или 100 бляшкообразующих единиц (БОЕ) на клетку, соответственно. Далее, в культуральную среду зараженных клеток вносили ЛО в различных концентрациях. Через 24 и 48 часов зараженные вирусом клетки суспендировали в 0,1 мл фосфатного буфера рН 7,0, содержащего 0,15М NaCl. После трехкратного цикла замораживания и оттаивания клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 3000 об/мин. В надосадочной жидкости определяли концентрацию инфекционного вируса и выражали в IgTCID₅₀. С этой целью свежес выращенные клетки *Vero* заражали десяти кратными разведениями исследуемых образцов и через 72 часа методом световой микроскопии определяли наличие

цитопатического действия ВГП-1. За титр вируса принимали то разведение, при котором поражение составляло не менее 50% клеточного монослоя.

Изучение влияния ЛО на экспрессию вирусных антигенов в инфицированных вирусом клетках проводили методом иммуноблоттинга. Через 24 часа роста зараженные клетки лизировали в 0,1 мл трис-HCl буфера pH 8,0, содержащем 0,5% додецилсульфат натрия (SDS) и 0,01% 2-меркаптоэтанола. Белки разделяли методом электрофореза в 10% полиакриламидном геле с 0,1% SDS на приборе фирмы Hoefer в течении 1 часа при 25 мА. Далее белки переносили на нитроцеллюлозные мембраны с помощью прибора Multiphor II, фирмы BioRad, при 0,8 мА на см². Для выявления вирусспецифических антигенов использовали кроличью гипериммунную сыворотку против ВГП-1 с титром 1:52 000. Вирусные антигены проявлялись в виде дискретных окрашенных полос. Идентификация антигенов приведена в следующем разделе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Результаты изучения ингибирования ЛО репродукции ВГП-1 в культуре клеток *Vero* представлены в таблице.

Таблица. Влияние ЛО на репродукцию ВГП-1 в культуре клеток *Vero*. Результаты выражены в lgТЦД₅₀.

| Концентрация ЛО в мкг/мл | Цитотоксичность | Начальная множественность инфицирования культур клеток <i>Vero</i> ВГП-1 | | | | | |
|-----------------------------|-----------------|--|-----------|---------------|-----------|----------------|-----------|
| | | 1 БОЕ/клетка | | 10 БОЕ/клетка | | 100 БОЕ/клетка | |
| | | 24 часа | 48 часов | 24 часа | 48 часов | 24 часа | 48 часов |
| 0 | - | 3,4 | 5,3 | 3,9 | 5,7 | 4,7 | 6,9 |
| 17,5 | + | не опред. | не опред. | не опред. | не опред. | не опред. | не опред. |
| 0,7 | - | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,5 | 3,5 |
| 0,07 | - | 0 | 0 | 0 | 2,2 | 3,0 | 4,0 |
| 0,007 | - | 0 | 1,8 | 1,7 | 3,0 | 3,5 | 5,2 |
| 0,0007 | - | 0 | 2,1 | 3,0 | 5,0 | 4,2 | 6,0 |

Сокращения: (+) токсичен, (-) - не токсичен. Не токсичен означает, что не было зарегистрировано статистически достоверного различия в количестве мертвых клеток между опытными и контрольными культурами. В контрольных культурах количество мертвых клеток не превышало 5%.

При концентрации ЛО ниже 17 мкг/мл культуральной среды, фермент не проявляет цитотоксического воздействия на клетки *Vero*. Значения концентраций ЛО, при которых проявляется антивирусная активность, составляет величины от 0,7 до 0,0007 мкг/мл. Увеличение концентрации ЛО до 1-2 мкг/мл не приводило к возрастанию антивирусной активности. При относительно небольшой множественности заражения клеток ВГП-1 (1 БОЕ/клетка) эффект подавления репродукции вируса наблюдался, начиная с концентрации ЛО 0,7 нг/мл, что свидетельствует о высокой специфической активности фермента. Повышение концентрации ЛО в культуральной среде до 70 нг/мл полностью блокирует развитие вирусного цитопатического действия, которое не проявляется и в последующие 5 суток наблюдения за опытными культурами. При высокой множественности заражения клеток вирусом (100 БОЕ/клетка) отмечается достоверное снижение титра инфекционного вируса почти на 3,5 lg (3,5 lg ТЦД₅₀) по сравнению с инфицированными культурами без ЛО (6,9 lg ТЦД₅₀). При концентрации ЛО 0,7 мкг/мл и множественности заражения 10 БОЕ/клетка процесс репродукции ВГП-1 подавляется полностью. Вирус не удалось обнаружить как через 48 часов, так и в последующие 5 суток наблюдения. Таким образом, можно заключить, что ЛО обладает

сильной антивирусной активностью. Причем, подавление биологической активности ВГП-1 реализуется уже на уровне 0,7 нг/мл, что соответствует уровню гормональной регуляции *in vivo*. Другой вопрос, проникает ли фермент внутрь клетки или действует опосредованно через плазматические мембраны.

Более детальный анализ антивирусной активности ЛО по подавлению экспрессии отдельных вирусных антигенов позволяет предположить, что антивирусная активность ЛО реализуется внутри клетки, поскольку ингибируется синтез не только поверхностных гликопротеинов ВГП-1, но и нуклеокапсидных и ДНК-связывающих белков вируса герпеса. Результаты представлены на рисунке. Видны отчетливые полосы вирусных антигенов с молекулярной массой 150-100 кДа (комплекс гликопротеида gB), 95 кДа (мажорный ДНК-связывающий белок), 80 кДа (gr 80), 65 кДа (минорный ДНК-связывающий белок), 56-58 кДа (гликопротеин дрД), 44 и 40 кДа - соответственно белки нуклеокапсида p44 и p40. Из рисунка видно, что действие ЛО на репродукцию ВГП-1 в культуре клеток проявилось в полном подавлении экспрессии оболочечных белков gB, gD, gr 80 и структурных нуклеокапсидных белков p44 и p40. Можно заключить, что ЛО из отечественного штамма *Trichoderma sp.* непосредственно подавляет синтез вирусных антигенов.

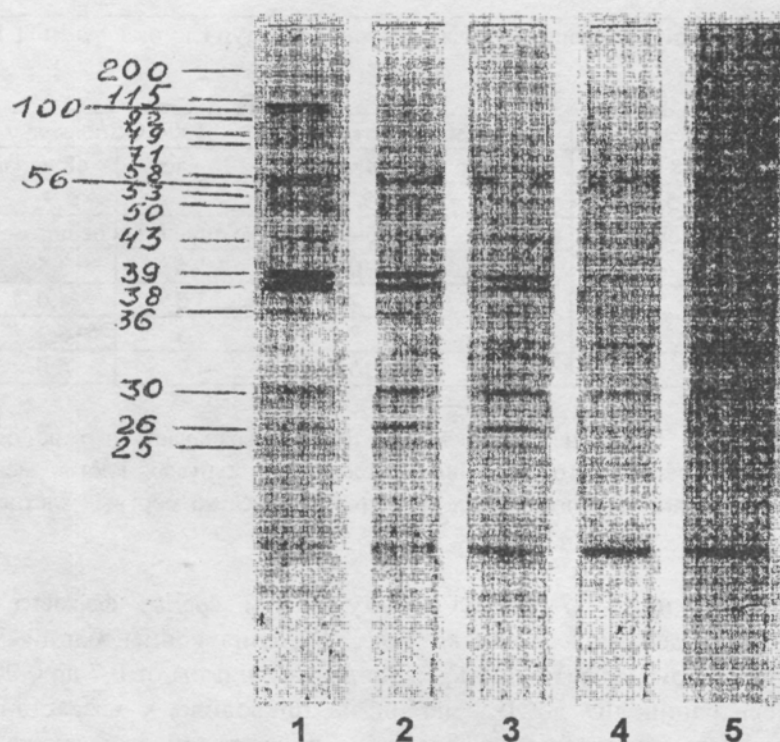


Рисунок.

Подавление экспрессии антигенов ВГП-1 L-лизин-α-оксидазой через 24 часа со множественностью заражения вирусом клеток линии Vero 10 БОЕ/клетка.

1. Контроль зараженных ВГП-1 клеток линии Vero.
2. То же с концентрацией ЛО 0,007 мкг/мл.
3. То же с концентрацией ЛО 0,07 мкг/мл.
4. То же с концентрацией ЛО 0,7 мкг/мл.
5. Контроль незараженных клеток.

Слева на рисунке представлены маркеры молекулярной массы белков кДа. Во всех экспериментах количество белка, вносимое в электрофоретическую лунку было одинаково и составляло 30 мкг.

Наиболее известны противогерпетические препараты, представляющие собой ациклонуклеозиды, ацикловир и флавоноиды, из которых активным в отношении ВГП-1 является лютеолин [8].

При концентрациях этих препаратов 50-100 мкг/мл ингибирующий эффект, оцененный по снижению $IgTЦД_{50}$, на клетки, культивируемые *in vitro* составляет 3,5-4,0. ЛО (0,7 мкг/мл) при высокой множественности заражения подавляет репродукцию ВГП-1 на 3,5 $Ig TЦД_{50}$. Используемая концентрация фермента оказалась в 100 раз ниже по сравнению с ацикловиром. Кроме того, данные препараты при длительном употреблении оказывают токсическое воздействие, и для получения положительного терапевтического результата необходимы большие дозы ацикловира и лютеолина. Кроме того, указанные препараты действуют также не на все типы вируса герпеса простого.

Таким образом, можно сделать предварительный вывод, что высокоочищенный фермент ЛО является более эффективным антигерпетическим агентом по сравнению с ациклонуклеозидами и флавоноидами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березов Т.Т. (1984). Вестн. АМН СССР, 8, 11-24.
2. Wiseman A. (1980) Technol. Biotechnol. 30 521-529.
3. Хадуев С.Х., Глазкова Т.Ю., Веса В.С. и др. (1989) Бюл. exper. биол. мед. №10, 476-477.
4. Хадуев С.Х., Уманский В.Ю., Веса В.С. и др. (1991) Бюл. exper. биол. мед. № 10, 419-422.
5. Хадуев С.Х., Уманский В.Ю., Заленюк С.И. и др. (1990), Бюл. exper. биол. мед., №5, 458-459.
6. Хадуев С.Х., Жукова О.С., Добрынин Я.В. и др. (1987). Бюлл. exper. биол. мед. №4. 458-460.
7. Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A. et al. (1980) Agric. Biol. Chem. 44 387-392.
8. Wleklik M., Luczak M., Panasiak W., et al (1988) Acta Virol. 32 522-525.

INFLUENCE OF L-LYSIN- α -OXIDASE ON THE REPRODUCTION OF HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 1 IN VITRO.

Smirnova I. P., Diorditsa S. V., Alekseev S. B., Zaitsev I. Z.

Department of Biochemistry, Russian Peoples' Friendship University

L-lysine- α -oxidase (LO), a fungal enzyme catalysing oxidative deamination of L-lysine, was used for the inhibition of the reproduction of herpes simplex virus type 1 (HSV-1). Antiviral activity of LO was tested *in vitro*. The expression of viral antigens and CPE of HSV-1 was inhibited by LO at a concentration 0,7 mg/ml.

Key Words: L-lysine- α -oxidase, reproduction, herpes virus.