

УДК 577.152.277:578.832.1

Противовирусная активность биназы в отношении вируса пандемического гриппа А (H1N1)

Р. Шах Махмуд*, О. Н. Ильинская

Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18

*E-mail: raihan.shah@gmail.com

Поступила в редакцию 15.05.2013

РЕФЕРАТ Отсутствие эффективных противовирусных препаратов затрудняет противодействие опасному РНК-содержащему вирусу гриппа типа А (H1N1). Установлено, что секретлируемая рибонуклеаза бацилл (биназа) проявляет противовирусную активность как при одноциклового, так и при многоциклового репродукции вируса гриппа А в диапазоне нетоксичных для эпителиальных клеток концентраций и множественности инфекции 0.01–0.1. Обработка вируса биназой в концентрации 1 мкг/мл в течение 15–30 мин снижала в 3–10 раз количество фокусобразующих единиц вируса и подавляла развитие вирусиндуцированного цитопатического действия в клетках легких человека линии А549. Обсуждаются возможные механизмы взаимодействия фермента с вирусом. Положительный заряд биназы, как и гемагглютинина вируса, обуславливает их электростатическое связывание с отрицательно заряженной сиаловой кислотой на клеточной поверхности с последующим проникновением в клетку. После потери капсидной оболочки и выхода вирусной РНК из эндосомы возможно ее непосредственное каталитическое расщепление интернализированной биназой. Полученные данные подтверждают перспективы использования биназы в качестве противовирусного агента, эффективного в отношении пандемического вируса гриппа А (H1N1). Несомненный прогресс в данном направлении исследований связан с установлением детальных механизмов противовирусного действия биназы и разработкой наиболее эффективного способа ее практического применения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антивирусная активность, вирус гриппа А (H1N1), рибонуклеаза *Bacillus intermedius*, цитотоксичность, эпителиальные клетки А549.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АЭК – 3-амино-9-этилкарбазол; ГАЕ – гемагглютинирующие единицы; МЖИ – множественность инфекции; ТФХК – L-тозиламид-2-фенилэтилхлорметилкетон; ФОЕ – фокусобразующие единицы.

ВВЕДЕНИЕ

Рибонуклеазы (РНКазы) в течение десятилетий привлекают внимание исследователей в качестве потенциальных терапевтических агентов. Ряд цитотоксических РНКаз обладает селективным действием в отношении опухолевых клеток [1–3] и проявляет противовирусную активность [4, 5]. Такими свойствами обладают РНКазы различного происхождения, среди которых наиболее хорошо изучены онконаза из ооцитов леопардовой лягушки *Rana pipiens*, BS-РНКаза из семенников быка и микробные РНКазы из *Bacillus amyloliquefaciens* и *B. intermedius* (новое название этого вида – *B. pumilus* [6]) – барназа и биназа. Панкреатическая рибонуклеаза поджелудочной железы крупного рогатого скота, выпускаемая как коммерческий препарат «Рибонуклеаза аморфная», рекомендована для лечения синуситов и клещевого энцефалита. Однако внутриклеточ-

ный ингибитор РНКаз, присутствующий в клетках человека, значительно снижает активность РНКаз млекопитающих [7], ограничивая их использование в медицинской практике. Онконаза и BS-РНКаза, в отличие от РНКазы А и РНКазы эозинофилов человека, способны подавлять репликацию вируса иммунодефицита человека типа 1 в клетках лейкоза Н9 без токсического воздействия на инфицированные клетки [4]. Биназа проявляет значительный защитный эффект (40–67%) при введении внутримышечно в место заражения уличным вирусом бешенства мышей, морских свинок, кроликов и не супрессирует развитие вакцинального антирабического иммунитета [5, 8]. Важно, что биназа не индуцирует синтез специфических маркеров иммунного ответа – антигена CD69 и γ -интерферона в популяции CD8⁺ и CD4⁺ Т-лимфоцитов, что свидетельствует об отсутствии у фермента свойств индуктора поликлонального

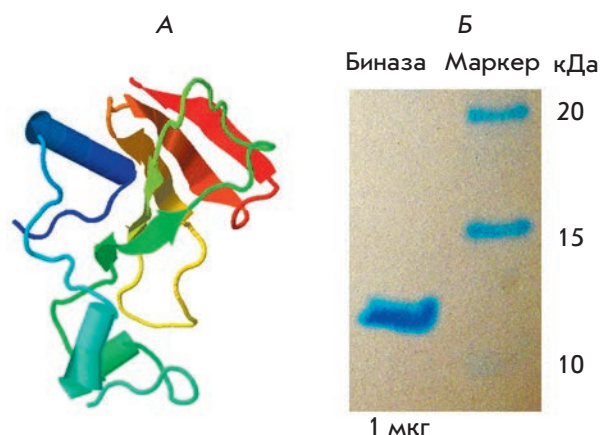


Рис. 1. Трехмерная структура РНКазы *Bacillus pumilus*, полученная с использованием программы Jmol (www.jmol.org; binase PDB id: 1buji) (А); электрофореграмма, подтверждающая чистоту использованного препарата биназы (Б)

Т-клеточного ответа по типу суперантигена [9]. Ранее было показано, что на куриных эмбрионах, зараженных вирусами гриппа типа А (А/PR/8/34, А/Одесса/2882/82) и типа В (В/Ленинград/369/76), биназа на два порядка снижала инфекционный титр вирусов, что сопоставимо с активностью ремантадина против вируса гриппа А [10].

В связи с широкой вариабельностью и повсеместным распространением вирусов, поиск действенных противовирусных препаратов остается актуальной задачей. Цель настоящей работы состояла в изучении эффектов биназы в отношении вируса пандемического гриппа А/Hamburg/04/09 (H1N1), возбудителя эпидемии 2009 года. Нами установлено, что кратковременная обработка вирусных частиц (15–30 мин) биназой в возрастающих концентрациях пропорционально снижает способность вируса инфицировать клетки аденокарциномы легкого А549 в 3–10 раз. Максимальным эффектом обладала биназа в концентрации 1 мкг/мл, не снижающей жизнеспособность эпителиальных клеток, что позволяет считать биназу перспективным противовирусным агентом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальная РНКаза

Биназа – гуанилспецифичная РНКаза *B. pumilus* 7Р (молекулярная масса 12,2 кДа, 109 аминокислотных остатков, рI 9,5) – выделена в гомогенном виде из культуральной жидкости *Escherichia coli* BL21, несущей плазмиду рGEMGX1/ent/Bi, согласно проце-

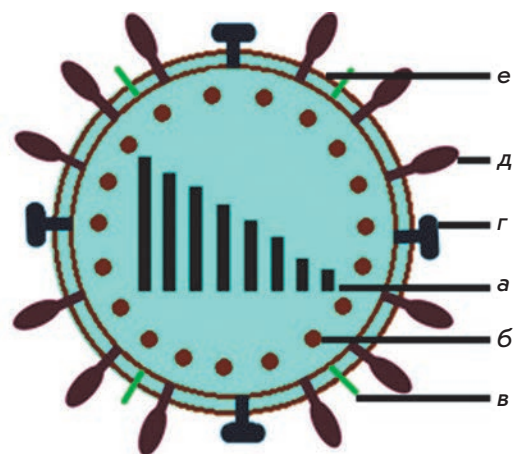


Рис. 2. Схематическое изображение вируса гриппа А (H1N1). а – восемь молекул вирусной РНК, кодирующих белки PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, М (M1, M2), NS (NS1, NS2); б – структурный белок М1; в – интегральный белок ионного канала в мембране вируса М2; г – нейраминидаза; д – гемагглютинин; е – липидный бислой вируса

дуре, описанной Шульгой и соавт. [11]. Молекулярная структура биназы известна (рис. 1А), чистота препарата подтверждена нами экспериментально (рис. 1Б). Каталитическая активность биназы по отношению к синтетическим субстратам и высокополимерной дрожжевой РНК охарактеризована ранее [12, 13].

Культуры клеток

Клетки эпителия аденокарциномы легкого А549 и почки собаки спаниеля MDCK II (коллекция Института медицинской вирусологии Университета им. Юстуса Либига, Гиссен, Германия) выращивали на среде DMEM с добавлением пенициллина (100 ед./мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки в атмосфере 5% CO₂ при 37°C.

Штамм вируса гриппа А/Hamburg/04/09 (H1N1)

Штамм вируса гриппа А/Hamburg/04/09 (H1N1) получен из коллекции Института вирусологии Университета Гиссена в виде вирусосодержащей суспензии. Материал вируса хранили при температуре -80°C. Схематическое изображение вируса и его основных компонентов представлено на рис. 2.

Жизнеспособность клеток

Жизнеспособность клеток в присутствии биназы определяли по активности митохондриальных дегидрогеназ, превращающих неокрашенное производное тетразолийбромида 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий (МТТ) (Sigma, Германия) в фиолетовые кристаллы формазана [14]. Интенсив-

ность окраски в тесте спустя 24 и 48 ч инкубации клеток с биназой в концентрации 0.01–1000 мкг/мл определяли спектрофотометрически при длине волны 590 нм после растворения кристаллов формазана в диметилсульфоксиде.

Рибонуклеазная активность

Рибонуклеазную активность в среде культивирования клеток A549 определяли по количеству кислото-растворимых продуктов гидролиза высокополимерной дрожжевой мРНК [15]. За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывало увеличение оптической плотности на одну оптическую единицу при 260 нм в пересчете на 1 мл раствора фермента за 1 ч инкубации при 37°C.

Количество вирусных частиц

Количество вирусных частиц в исходной суспензии фага определяли с помощью стандартного теста на гемагглютинацию с использованием 1.5% взвеси куриных эритроцитов [16, 17]. Количество вирусных частиц выражали в гемагглютинирующих единицах (ГАЕ) на 1 мл, отражающих максимальную кратность разведения вирусосодержащей суспензии, вызывающей гемагглютинацию эритроцитов.

Инфекционный титр вируса

Инфекционный титр вируса определяли иммуногистохимически по количеству фокусобразующих единиц (ФОЕ) [18]. Для этого вирусную суспензию добавляли к монослою клеток MDCK II. Инфицирование проводили в течение 1 ч в темноте при комнатной температуре, после чего удаляли вирусную суспензию. Затем клетки выращивали при 37°C и 5% CO₂ в поддерживающей среде DMEM-Avicel с добавлением 1.25% микрокристаллической целлюлозы (FMC, Бельгия), 0.36% бычьего сывороточного альбумина и трипсина, обработанного ингибитором химотрипсина ТФХК (Sigma, США) в конечной концентрации 1 мкг/мл. Спустя 28 ч культуральную жидкость сливали, а клетки фиксировали в течение 90 мин ледяным Тритоном X-100, обрабатывали мышинными антителами к белку NP вируса гриппа, а затем вторичными антимышиными антителами, мечеными пероксидазой хрена (ПХ) (Santa Cruz Biotechnology, США), окрашивали раствором АЭК (Sigma, США) в диметилформамиде, сканировали плашку и подсчитывали количество ФОЕ. Инфекционный титр выражали в ФОЕ на 1 мл вирусосодержащей суспензии.

Репродукция вирусов

Репродукцию вирусов оценивали на монослое суточной культуры A549 (3 × 10⁴ клеток в лунке) при заражении вирусом в соотношении 1 и 10 вирусных

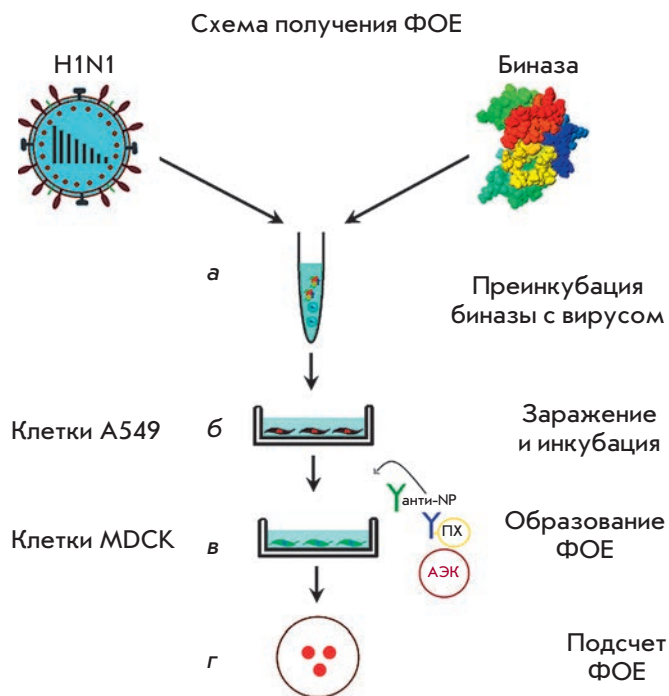


Рис. 3. Схема постановки реакции образования ФОЕ. а – преинкубация вирусов с биназой (15–60 мин); б – заражение клеток A549 вирусом, обработанным биназой, с последующим культивированием клеток в течение 12–24 ч; в – анализ содержания вирусов в культуральной жидкости клеток A549 по показателю образования ФОЕ в культуре клеток MDCK, культивируемых 28 ч с последующим добавлением первичных NP-антител к вирусу и вторичных антимышиных антител, меченных пероксидазой хрена; г – прямой подсчет ФОЕ

частиц на 100 клеток (множественность инфекции (МЖИ) 0.01 и 0.1 соответственно). Для анализа влияния биназы на инфицирующую способность вируса РНКазу преинкубировали с вирусом в течение 15–60 мин и затем заражали клетки A549. Для адсорбции вируса клетки выдерживали в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте. Неадсорбированный вирус удаляли, инфицированные клетки инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в среде DMEM с добавлением 0.36% бычьего сывороточного альбумина и ТФХК-трипсина (1 мкг/мл). Через 12 ч (одноцикловая репродукция вируса) и 24 ч (многоцикловая репродукция) отбирали супернатант, в котором определяли ФОЕ. Оставшиеся в лунках клетки промывали фосфатным буфером и окрашивали 1.25% раствором Кумасси бриллиантового синего R-250 (Merck, Германия) для визуализации выживших после инфекции клеток. Схема эксперимента представлена на рис. 3.

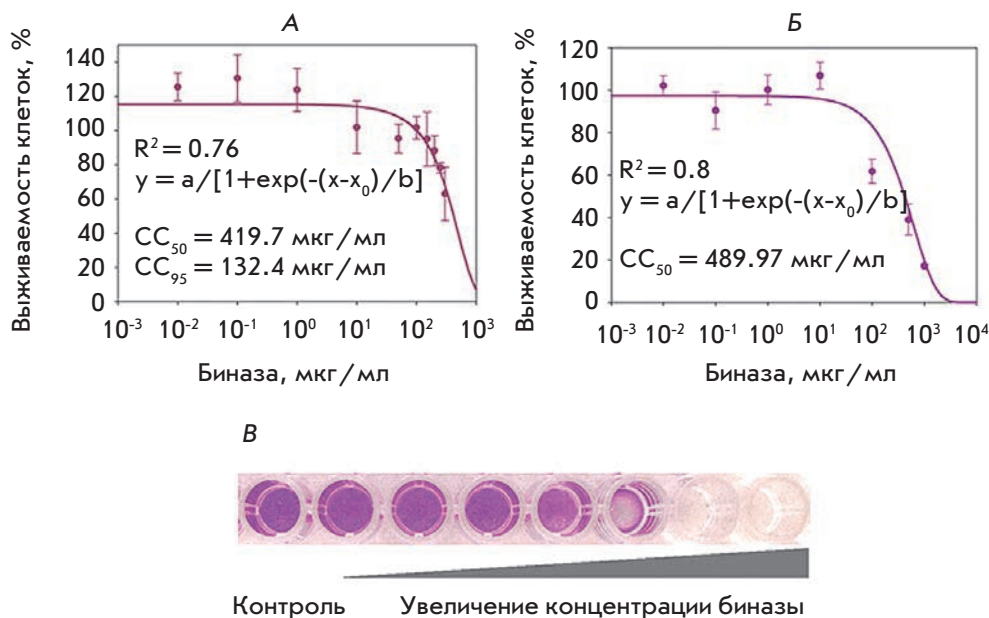


Рис. 4. Выживаемость клеток А549 при различных концентрациях биназы в течение 24 (А) и 48 ч (Б). Представлены величины статистической значимости аппроксимации, рассчитанные в программе SigmaPlot 10. CC_{50} и CC_{95} – концентрация биназы, вызывающая гибель 50 и 5% клеток соответственно. В – визуализация гибели клеток А549 при возрастающих концентрациях биназы (МТТ-тест)

Статистическая обработка

Статистическую обработку результатов, полученных из четырехкратных повторностей каждого эксперимента, проводили стандартными методами в программах Microsoft Excel 2010 и SigmaPlot 10.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цитотоксичность биназы в отношении клеток аденокарциномы А549

Выявлено зависимое от концентрации биназы и времени ее воздействия угнетение жизнеспособности клеток линии А549 аденокарциномы легкого человека вплоть до их полной гибели при концентрации фермента, приближающейся к 1 мг/мл среды (соответствует 82 мкМ). Цитотоксическая концентрация биназы, вызывающая гибель 50% клеток (CC_{50}), составила 420–490 мкг/мл при одно- и двухсуточной экспозиции соответственно (рис. 4А,Б). Для индукции гибели 5% клеток за 24 ч необходимо присутствие в среде биназы в концентрации 133 мкг/мл (CC_{95}) (рис. 4А). При обработке биназой в течение 48 ч эта величина была значительно меньше, 15 мкг/мл (данные не представлены). Таким образом, концентрации биназы, нетоксичные для клеток, культивируемых в течение 1 сут, находятся в диапазоне до 133 мкг/мл. Эти данные согласуются с результатами оценки цитотоксичности биназы в отношении клеток линии А549, полученными ранее с использованием теста WST и цитометрии [19]. Поскольку цитотоксическое действие биназы более выражено в случае малигнизированных клеток эпителия легких,

чем нормальных [20], можно считать, что даже увеличение концентрации РНКазы на порядок не будет оказывать негативного влияния на жизнеспособность нормальных эпителиальных клеток.

Большинство РНКаз, участвующих в защите клеток от вирусной инфекции, синтезируются самими клетками хозяина и направляют их на путь апоптотической гибели. У животных противовирусный иммунитет обеспечивают рибонуклеазы семейства РНКазы А [21, 22], в том числе РНКазы L, активация которой вызывает апоптоз в инфицированных клетках [23]. Рибонуклеазы эозинофилов снижают инфекционность вирусных частиц *in vitro*, проникая в вирусный капсид и разрушая геномную РНК вируса [24]. Изучение РНКаз, введенных извне, показало, что панкреатическая РНКазы проявляет противогриппозную активность на куриных эмбрионах, которые не содержат ингибитор рибонуклеаз млекопитающих, но не обладает такой активностью на мышках [10]. Онконаза способна селективно разрушать РНК вируса иммунодефицита человека, не затрагивая РНК хозяйских клеток [25]. Однако аналогичная РНКазы лягушки *Rana catesbeiana* не только ингибировала репликацию вируса японского энцефалита, но и стимулировала апоптоз в вирусинфицированных клетках [26]. Нами установлено, что биназа в используемых концентрациях не приводит к гибели эпителиальных клеток, и, кроме того, представляет собой неиммуногенный белок, не вызывающий Т-клеточный ответ по типу суперантигена [9], что значительно улучшает перспективы практического использования этой РНКазы.

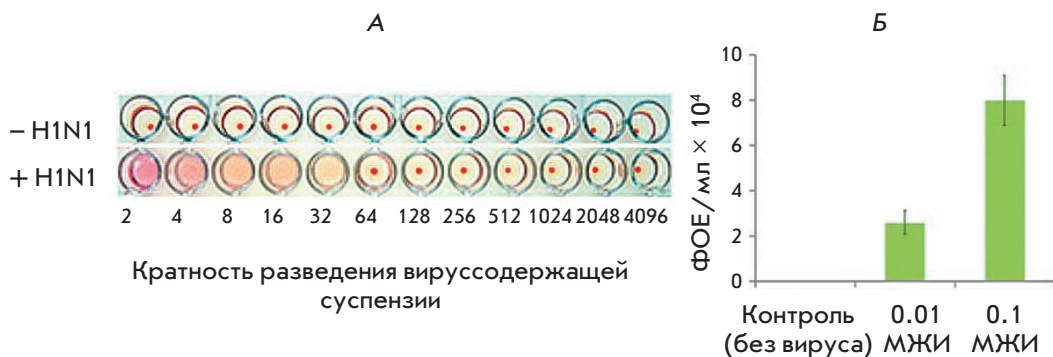


Рис. 5. Анализ вирусосодержащего материала на наличие вирусных частиц по образованию ГАЕ, рассчитанными как кратность разведения (А), и ФОЕ после 24 ч культивирования клеток А549 при разной МЖИ (Б)

Снижение инфекционного титра вируса гриппа А (H1N1) под действием биназы

Проведенный тест на гемагглютинацию показал, что в исходном вирусосодержащем материале гемагглютининовый титр вируса А/Hamburg/04/09 составил 32 ГАЕ/мл (рис. 5А), что свидетельствует о достаточном содержании вирусных частиц в суспензии и позволяет анализировать его устойчивость к противовирусным агентам. Заражение клеток А549 вирусом при МЖИ 0.01 и 0.1 показало, что вирус обладает высокой инфицирующей способностью, при этом с увеличением множественности инфекции увеличивалось и количество ФОЕ в лунках планшета (рис. 5Б). Расчетная величина инфекционного титра вирусосодержащего материала составила 5.8×10^6 ФОЕ/мл.

С целью определения противовирусного эффекта биназы вирус преинкубировали в течение 30 и 60 мин с ферментом в концентрации ниже выявленной цитотоксической, а именно 10^{-4} – 10^1 мкг/мл. Затем этой суспензией заражали клетки А549, устанавливая степень их инфицированности при 0.1 МЖИ.

При одноциклового репликации вируса, когда зараженные клетки растили в течение 12 ч, титр

вируса снижался пропорционально увеличению концентрации биназы (рис. 6). При обработке в течение 30 мин биназой в концентрации 1 мкг/мл репродукция вируса снижалась в 3 раза (рис. 6А). При многоциклового репликации, продолжавшейся 24 ч, противовирусный эффект биназы был выше: зарегистрировано снижение репродукции вируса в 6 раз после обработки биназой в концентрации 10 мкг/мл в течение 60 мин (рис. 7Б). Как при одноциклового, так и при многоциклового репликации клетки А549 погибали от цитопатического действия вируса (рис. 6Б, 7В, лунки без биназы). Однако количество клеток, оставшихся в монослое, увеличивалось при повышении концентраций биназы, использованных для обработки вируса. Максимальное подавление репродукции вируса (до 10 раз) наблюдалось через 1 сут после заражения клеток вирусом, преинкубированным в течение 30 мин с биназой в концентрации 1 мкг/мл (рис. 7А).

Поскольку биназа была наиболее эффективной при многоциклового репликации вируса, в дальнейшем мы оценивали противовирусное действие биназы через 1 сут после заражения, варьируя время преинкубации вируса с ферментом от 15 до 60 мин

Таблица 1. Снижение инфекционного титра вируса по сравнению с титром в исходной суспензии при многоциклового инфекции под действием биназы в зависимости от уровня инфицированности клеток вирусом и времени его преинкубации с ферментом

Биназа, мкг/мл	Преинкубация вируса с биназой, мин					
	15	30	60	15	30	60
	0.1 МЖИ			0.01 МЖИ		
0	100 ± 25.3	100 ± 19.2	100 ± 18.1	100 ± 21.0	100 ± 7.4	100 ± 35.4
1	17.5 ± 9.0*	9.7 ± 4.5*	43.6 ± 9.4*	36.4 ± 9.8*	27.5 ± 3.5*	93.8 ± 36.9

*Статистически значимые отличия от контроля без обработки вируса биназой. За 100% принят титр вируса в исходном материале, не обработанном биназой.

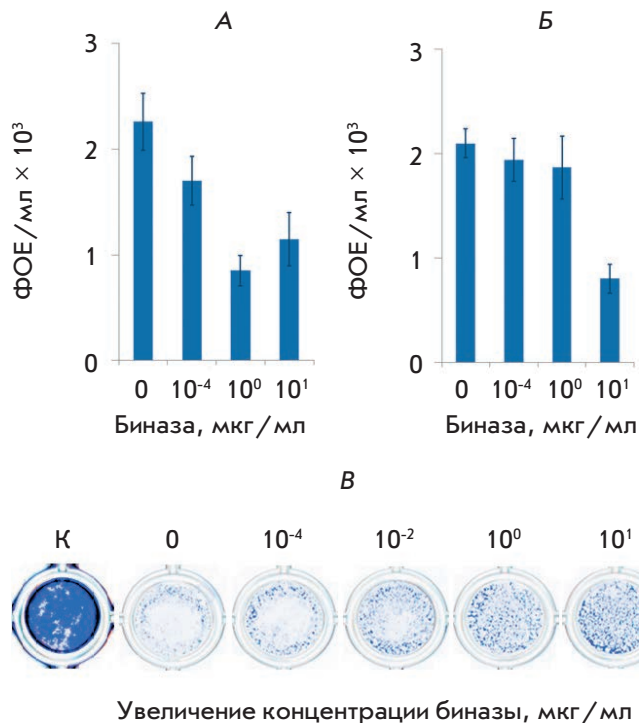


Рис. 6. Снижение под действием биназы числа инфекционных вирусных единиц после преинкубации с ферментом в течение 30 (А) и 60 мин (Б); повышение выживаемости клеток А549, зараженных вирусом после обработки биназой в различной концентрации и культивируемых в течение 12 ч. Визуализация клеток А549 красителем Кумассии бриллиантовый синий (В)

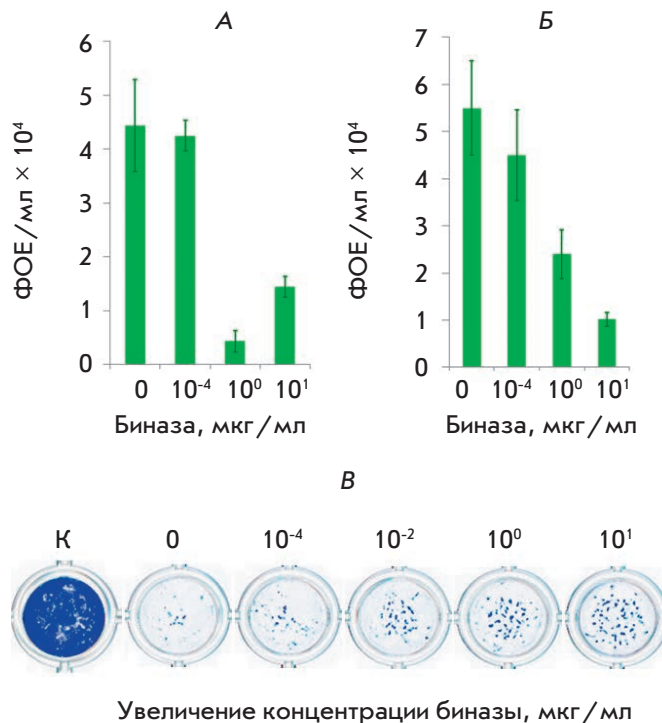


Рис. 7. Снижение под действием биназы числа инфекционных вирусных единиц после преинкубации с ферментом в течение 30 (А) и 60 мин (Б); повышение выживаемости клеток А549, зараженных вирусом после обработки биназой в различной концентрации и культивируемых в течение 24 ч. Визуализация клеток А549 с красителем Кумассии бриллиантовый синий (В)

при двух различающихся на порядок уровнях заражения клеток А549 (0.1 и 0.01 МЖИ) (рис. 8А, табл. 1). Установлено, что противовирусный эффект биназы зависит как от времени преинкубации с вирусом, так и от степени заражения клеток вирусом. Высокий уровень инфекции (0.1 МЖИ) обеспечивает, по-видимому, большую возможность контакта вируса с молекулами биназы, вследствие чего эффект биназы более выражен, чем при низком уровне инфицированности клеток (0.01 МЖИ) (табл. 1).

При любом уровне инфицирования клеток наибольший противовирусный эффект наблюдали после преинкубации биназы с вирусом в течение 30 мин, более длительная преинкубация (60 мин) в 3 раза снижала противовирусный эффект (табл. 1). Поскольку противовирусная активность биназы при низком (0.01 МЖИ) уровне заражения клеток вирусом и обработке ферментом в течение 15 и 30 мин отличалась незначительно, краткосрочную инкубацию вируса с РНКазой (15 мин) можно рассматривать как достаточную для проявления оптимальной

противовирусной активности. Биназа в концентрации 1 мкг/мл за время предобработки (15 мин) приводит к снижению числа вирусных частиц в клетках примерно в 6 раз при 0.1 МЖИ и в 3 раза при 0.01 МЖИ (табл. 1). Увеличение концентрации РНКазы до 10 мкг/мл не приводило к дальнейшему снижению титра вируса, если обработку проводили в течение 30 мин (рис. 6А, 7А), но повышало противовирусную эффективность биназы при предобработке в течение 60 мин (рис. 6Б, 7Б).

Таким образом, нетоксичные для эпителиальных клеток А549 концентрации биназы (от 1 до 10 мкг/мл) ингибируют репродукцию вируса гриппа А (H1N1), предобработанного биназой в течение 15–30 мин.

Иммунофлуоресцентными методами показано, что уже в течение первых часов культивирования биназа проникает в клетки А549 [27]. Известно также, что в клетках миелоидных предшественников биназа сохраняет свою каталитическую активность в течение 48 ч [28]. Нами зарегистрировано снижение каталитической активности биназы в куль-

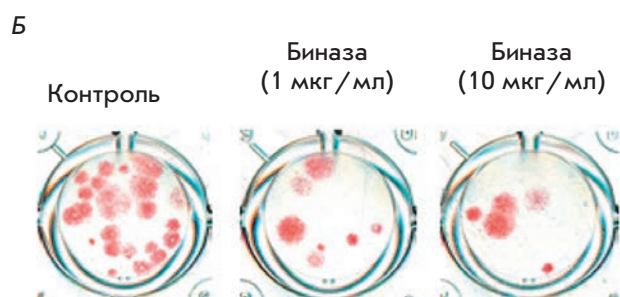
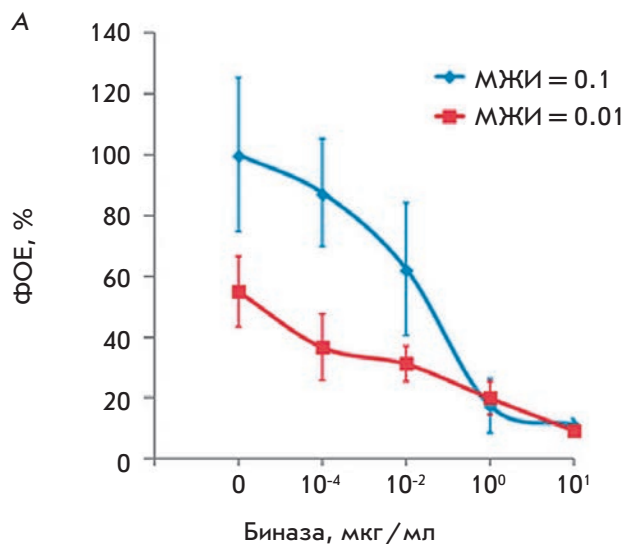


Рис. 8. Снижение под действием биназы числа инфекционных вирусных единиц после преинкубации с ферментом в течение 15 мин (А), и визуализация уменьшения числа ФОЕ на клетках MDCK (Б). За 100% принято значение ФОЕ/мл при 0.1 МЖИ без обработки биназой

туральной жидкости клеток A549, обработанных биназой в концентрации 1 и 10 мкг/мл (табл. 2), что также свидетельствует о проникновении фермента внутрь клетки. Механизм интернализации рибонуклеазы обусловлен взаимодействием катионного белка с отрицательным зарядом поверхности опухолевых клеток; дальнейшее проникновение РНКазы в клетку происходит путем эндоцитоза [1]. Поскольку вирус поглощается клеткой аналогичным путем, биназа может взаимодействовать с вирусом и внутри клетки, в частности в составе эндосом. Рецепторы гемагглютинина вируса гриппа на поверхности клеток хозяина несут отрицательный заряд, обусловленный сиаловой кислотой [29, 30], следовательно, биназа способна электростатически взаимодействовать с поверхностью таких клеток независимо от вируса и проникать в них. В клетках, зараженных вирусом, биназа будет расщеплять вирусную РНК по крайней мере в течение 48 ч, пока

Таблица 2. Снижение каталитической активности биназы в культуральной жидкости клеток A549 (ед./мл) после 48 ч культивирования

Биназа, мкг/мл	0 ч	48 ч
0	5.3 ± 1.4	63.0 ± 9.3
1	7107.1 ± 770.7	4078.3 ± 462.7
10	64600.0 ± 6648.7	45000.0 ± 5870.0

сама не будет гидролизована клеточными протеазами [28]. Важно отметить, что высокая термостойкость биназы и сохранение ее активности в широком диапазоне pH [31] является одним из важных факторов, обуславливающих возможность использования данного фермента.

Показано, что биназа проявляет противовирусную активность в отношении вируса бешенства, ящера, ряда вирусов растений, а также сезонного гриппа [8, 10, 32]. От вируса гриппа в мире ежегодно умирают до 0.5 млн человек. По данным ВОЗ, только пандемическим гриппом, вызванным вирусом А (H1N1), на октябрь 2009 года заболели 414000 человек и умерли 5000 из них (www.who.int). Эффективность признанных в настоящее время защитных стратегий, включая вакцинацию, прием ингибиторов нейраминидазы, ограничена, поскольку вирус постоянно изменяется посредством антигенного дрейфа и смешения генетического материала вирусов. В связи с этим важно выработать новую терапевтическую стратегию, эффективность которой не зависит от подтипа вируса. Наши данные свидетельствуют о перспективности разработки противовирусной терапии на основе бактериальных РНКаз. Биназа, обладающая рядом преимуществ перед эукариотическими аналогами (нечувствительность к ингибитору РНКаз млекопитающих, простота получения), может стать противовирусным агентом нового поколения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Борьба с пандемиями вирусов гриппа типа А/H1N1 является одной из актуальных задач современной науки в связи с масштабными убытками в социально-экономической сфере, связанными с заболеваемостью гриппом. Быстрое распространение вирусной инфекции может быть сдержано применением препаратов широкой специфичности, эффективных независимо от конкретных мутаций вирусного генома. Нами показано, что секретлируемая рибонуклеаза *B. intermedius* (биназа) нетоксична для эпителиальных клеток человека в диапазоне концентраций,

проявляющих противовирусную активность. Предварительная обработка вирусных частиц биназой в концентрациях порядка 1 мкг/мл приводила к значительному снижению инфекционности вируса (до 10 раз) и подавляла развитие вирусиндуцированного цитопатического действия в линии клеток A549 легкого человека при различной множественности инфекций как при одноцикловой, так и при многоцикловой репродукции вируса. Тонкие механизмы противовирусного действия бациллярной РНКазы нуждаются в дальнейшем изучении, хотя можно считать, что они включают как заряд-зарядовое взаимодействие катионной биназы с отрицательно заряженными рецепторами гемагглютинаина на поверхности клеток хозяина, так и каталитическое расщепление вирусной РНК внутри клеток. Полученные данные подтверждают возможность применения биназы как эффективного в отношении пандемического гриппа А (H1N1) противовирусного агента. ●

Авторы благодарят проф. С. Плешку из Университета им. Юстуса Либига (Гиссен, Германия) за возможность проведения ряда экспериментов в его лаборатории, а также сотрудников кафедры микробиологии КФУ В.И. Вершинину и В.В. Ульянову за плодотворную дискуссию.

Работа поддержана РФФИ (грант № 12-04-01226а), программой «Евгений Завойский» (ДААД совместно с Минобрнауки Республики Татарстан), ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (государственный контракт № 16.740.11.0611), субсидией, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Makarov A.A., Ilinskaya O.N. // FEBS Lett. 2003. V. 540. № 1–3. P. 15–20.
- Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. // Bioessays. 2008. V. 30. № 8. P. 781–790.
- Ardelt W., Ardel B., Darzynkiewicz Z. // Eur. J. Pharmacol. 2009. V. 625. № 1–3. P. 181–189.
- Youle R.J., Wu Y.N., Mikulski S.M., Shogen K., Hamilton R.S., Newton D., D'Alessio G., Gravel M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. № 13. P. 6012–6016.
- Грибенча С.В., Поцелуева Л.А., Баринский И.Ф., Баландин Т.Г., Деев С.М., Лещинская И.Б. // Вопросы вирусологии. 2004. Т. 49. № 6. С. 38–41.
- Шарипова М.Р., Тойменцева А.А., Сабирова А.Р., Мухаметзянова А.Д., Ахметова А.И., Марданова А.М., Балабан Н.П. // Микробиология. 2011. Т. 80. № 3. С. 424–426.
- Leland P.A., Raines R.T. // Chem. Biol. 2001. V. 8. № 5. P. 405–413.
- Грибенча С.В., Поцелуева Л.А., Баринский И.Ф., Деев С.М., Баландин Т.Г., Лещинская И.Б. // Вопросы вирусологии. 2006. Т. 51. № 5. С. 41–43.
- Ilinskaya O.N., Zelenikhin P.V., Petrushanko I.Y., Mitkevich V.A., Prassolov V.S., Makarov A.A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. V. 361. № 4. P. 1000–1005.
- Шнейдер М.А., Штильбанс Е.Б., Куприянов-Ашин Э.Г., Поцелуева Л.А., Заиконникова И.В., Куриненко Б.М. // Антибиотики и химиотерапия. 1990. Т. 35. № 3. С. 27–33.
- Schulga A., Kurbanov F., Kirpichnikov M., Protasevich I., Lobachev V., Ranjbar B., Chekhov V., Polyakov K., Engelborghs Y., Makarov A. // Protein Eng. 1998. V. 11. № 9. P. 775–782.
- Yakovlev G.I., Moiseyev G.P., Struminskaya N.K., Borzykh O.A., Kipenskaya L.V., Znamenskaya L.V., Leschinskaya I.B., Chernokalskaya E.B., Hartley R.W. // FEBS Lett. 1994. V. 354. № 3. P. 305–306.
- Ilinskaya O.N., Karamova N.S., Ivanchenko O.B., Kipenskaya L.V. // Mutat. Res. 1996. V. 354. № 2. P. 203–209.
- Mosmann T. // J. Immunol. Methods. 1983. V. 65. № 1–2. P. 55–63.
- Anfinsen C.B., Redfield R.R., Choate W.I., Page J., Carrol W.R. // J. Biol. Chem. 1954. V. 207. P. 201–210.
- Wegmann T.G., Smithies O. // Transfusion. 1966. V. 6. № 1. P. 67–73.
- Pleschka S., Stein M., Schoop R., Hudson J.B. // Virol. J. 2009. V. 6. № 197. (doi:10.1186/1743-422X-6-197)
- Payne A.F., Binduga-Gajewska I., Kauffman E.B., Kramer L.D. // J. Virol. Meth. 2006. V. 134. № 1–2. P. 183–189.
- Кабрера-Фуентес Э.А., Зеленихин П.В., Колпаков А.И., Ильинская О.Н. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2012. Т. 7. № 3. С. 72–76.
- Кабрера-Фуентес Э.А., Зеленихин П.В., Колпаков А.И., Прайсснер К.Т., Ильинская О.Н. // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2010. Т. 152. № 3. С. 143–148.
- Rosenberg H.F., Domachowske J.B. // J. Leukoc Biol. 2001. V. 70. № 5. P. 691–698.
- Rosenberg H.F., Domachowske J.B. // Curr. Pharm. Biotechnol. 2008. V. 9. № 3. P. 135–140.
- Liang S.L., Quirk D., Zhou A. // IUBMB Life. 2006. V. 58. № 9. P. 508–514.
- Domachowske J.B., Dyer K.D., Adams A.G., Leto T.L., Rosenberg H.F. // Nucl. Acids Res. 1998. V. 26. № 14. P. 3358–3363.
- Saxena S.K., Gravel M., Wu Y.N., Mikulski S.M., Shogen K., Ardel W., Youle R.J. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. № 34. P. 20783–20788.
- Lee Y.H., Wei C.W., Wang J.J., Chiou C.T. // Antiviral Res. 2011. V. 89. № 3. P. 193–198.
- Cabrera-Fuentes H.A., Aslam M., Saffarzadeh M., Kolpakov A., Zelenikhin P., Preissner K.T., Ilinskaya O.N. // Toxicon. 2013. V. 69. P. 219–226.
- Mitkevich V.A., Tchurikov N.A., Zelenikhin P.V., Petrushanko I.Y., Makarov A.A., Ilinskaya O.N. // FEBS J. 2010. V. 277. P. 186–196.
- Arinaminpathy N., Grenfell B. // PLoS One. 2010. V. 5. № 12. e15674. (doi: 10.1371/journal.pone.0015674)
- Kobayashi Y., Suzuki Y. // PLoS One. 2012. V. 7. № 7. e40422. (doi: 10.1371/journal.pone.0040422)
- Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O. // FEBS J. 2011. V. 278. № 19. P. 3633–3643.
- Алексеева И.И., Куриненко Б.М., Клейнер Г.И., Скуя А.Ж., Пензикова Г.А., Орешина М.Г. // Антибиотики. 1981. Т. 26. № 7. С. 527–532.