

**БИОХИМИЯ
И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ**

УДК 57.042.2+615.281.8

**ПРОТИВОВИРУСНЫЙ ЭФФЕКТ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ
В КОМБИНАЦИИ С «БЕТАДИНОМ»***Э.Ф. Зайнутдинова, И.А. Рассохина, М.Н. Филимонова***Аннотация**

Установлена возможность улучшения противовирусного эффекта при комбинировании эндонуклеазы грамотрицательных бактерий *Serratia marcescens* и «Повидон-йода», обладающих собственным противовирусным эффектом. Сравнительный анализ противовирусного эффекта показал, что комбинирование препаратов почти в 10 раз сокращает время достижения результата, получаемого с каждым из препаратов по отдельности. Обнаружена прямая зависимость вирулицидного эффекта «Повидон-йода» и эндонуклеазы от содержания активного вещества и времени инкубации с фаговой суспензией и отсутствие зависимости от плотности вирусной суспензии.

Ключевые слова: *Serratia marcescens*, «Повидон-йод», эндонуклеаза, противовирусный эффект.

Введение

«Повидон-йод» – один из самых эффективных йодосодержащих антисептических средств широкого спектра действия в отношении микроорганизмов различных групп включая энтеро- или аденовирусы, вирусы гриппа, полиомиелита, герпеса и др. [1]. Случаев развития резистентности микроорганизмов к «Повидон-йоду» не описано, что выгодно отличает его от антисептиков, содержащих антибиотики [2]. Он реже, чем антибиотики, вызывает аллергию [3]. Антисептическое действие «Повидон-йода» обусловлено сильным окислительным эффектом, что часто ограничивает сферы его применения, поскольку «Повидон-йод» может вызвать раздражение контактирующих с ним органов и тканей [4]. К расширению сфер его применения, вероятно, могло бы привести ослабление раздражающего действия за счет снижения содержания активного компонента и комбинирование с другим препаратом. Снижение содержания активного вещества понижает вирулицидную активность [5]. Компенсировать снижение эффективности, вероятно, можно, дополнив действие одного препарата другим [6]. В качестве такого препарата была выбрана эндонуклеаза грамотрицательных бактерий *Serratia marcescens* – одна из наиболее изученных бактериальных нуклеаз, применяемая в биохимических исследованиях и молекулярной биологии, а также в сельском хозяйстве в качестве противовирусного

препарата [7–13]. Очевидной также является необходимость сочетания противовирусного действия с борьбой против бактериальных, грибковых и инвазионных поражений, часто имеющих комбинированный характер. Именно поэтому актуальной задачей и целью настоящего исследования являлась проверка совместимости фермента эндонуклеазы *Serratia marcescens* и фармакологического соединения «Повидон-йода» с последующим созданием комплексного препарата. Для достижения цели в качестве модели была выбрана система фаг/хозяин включающая бактерии *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS и бактериофаг λ bII.

1. Материалы и методы

В исследовании использовали «Повидон-йод» (коммерческое название «Бетадин») в виде 10%-ного раствора с концентрацией активного йода 1%.

Грамотрицательные бактерии *Serratia marcescens* (сем. Enterobacteriaceae), штамм W 1050, профессором М. Бенедиком (M. Benedik), Хьюстонский университет (США), система фаг/хозяин, включающая бактерии *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS и бактериофаг λ bII, была разработана и любезно предоставлена профессором Ю. Джозефсен (J. Josephsen), Королевский университет ветеринарии и сельского хозяйства (Дания). Эндонуклеазу *S. marcescens* (изоформа Sm1) получали, как описано ранее [14].

Для подготовки бактериальной суспензии бактерии инкубировали 24 ч на среде LB с 0.005%-ным ампициллином при 37 °С без принудительной аэрации, затем добавляли двукратный объем свежей среды LB с 0.005%-ным ампициллином и инкубировали 12 ч при тех же условиях.

Для получения фаговой суспензии инфицированную фагом бактериальную суспензию центрифугировали 15 мин при 5 тыс. об/мин и отделяли супернатант.

При определении зависимости вирулицидного эффекта от концентрации активного вещества вирусную суспензию, разведенную питательной средой в 10 раз, смешивали с равным объемом «Повидон-йода» без разведения и разведенного последовательно дистиллированной водой в 10, 100, 1000, 10000, 100000, 1000000 раз или раствором эндонуклеазы в 0.1 М Трис-НСl буфере, pH 8.5, содержащим 0.01 М MgSO₄, с активностью 100, 5000, 10000 и 100000 ед./мл и инкубировали 6 мин при комнатной температуре. Затем смесь добавляли к заранее подготовленной бактериальной суспензии, инкубировали 30 мин при 37 °С и определяли число жизнеспособных фаговых частиц. Контролем служила интактная вирусная суспензия.

При установлении зависимости вирулицидного эффекта от времени инкубации вирусную суспензию смешивали с равным объемом эндонуклеазы с активностью 10000 ед./мл или «Повидон-йода», предварительно разведенного в 100000 раз дистиллированной водой, и инкубировали 6 мин, 60 мин, 6 ч, 24 ч в темноте для предотвращения распада действующего вещества «Повидон-йода» под действием света. Затем определяли число жизнеспособных бактериофагов.

Действие препаратов в зависимости от плотности фаговой суспензии исследовали аналогично определению зависимости вирулицидного эффекта от концентрации активного вещества, используя вирусную суспензию без разведения. «Повидон-йод» предварительно разводили в 100 раз дистиллированной водой. Использовали раствор эндонуклеазы здесь и далее с активностью 10000 ед./мл.

Действие препаратов в зависимости от объемного соотношения с фаговой суспензией исследовали аналогично определению вирулицидного эффекта от концентрации активного вещества, при соотношениях препарат : фаг, равных 1 : 1 и 5 : 1. «Повидон-йод» предварительно разводили дистиллированной водой в 100 раз.

Комбинированное действие препаратов исследовали, предварительно смешав в равных частях «Повидон-йод», разведенный в 100000 раз, и раствор эндонуклеазы. Затем к полученной смеси добавили равный объем суспензии бактериофагов и через 6 мин инкубации определяли снижение жизнеспособности фаговых частиц стандартным методом.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью подпрограммы статистического анализа графической программы Sigma plot 8.0 и программы Microsoft Excel. Сравнение полученных результатов проводили с использованием параметрических критериев различия (оценка достоверности разности t_d , критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественного сравнения). Для оценки достоверной разницы групп данных принимали достаточным уровень значимости $p = 0.05$ для достоверной разницы групп данных. На графике представлены 95%-ные доверительные интервалы для истинных средних.

2. Результаты и их обсуждения

Как видно из рис. 1, наблюдается прямая зависимость вирулицидного эффекта «Повидон-йода» от его концентрации. Так, исходный или разведенный в 10 раз препарат, содержащий соответственно 10% или 1% повидон-йода, вызывал полную утрату жизнеспособности фагов, о чем свидетельствовало отсутствие стерильных пятен в обоих вариантах опыта. При разведении препарата в $10^2 - 10^6$ раз вирулицидный эффект снижался пропорционально разведению, увеличивая жизнеспособность фаговой суспензии на 50–85% по сравнению с двумя предыдущими вариантами¹.

Увеличение плотности вирусной суспензии на порядок не оказывало влияния на эффективность действия ни «Повидон-йода», что видно из результатов, представленных в табл. 1, ни эндонуклеазы (табл. 2).

Напротив, при изменении соотношения объемов «Повидон-йода» и вирусной суспензии, что достигнуто пятикратным увеличением объема «Повидон-йода», наблюдали достоверное увеличение вирулицидного эффекта, составляющее 12% (рис. 2).

Эффект возрастал и с увеличением времени инкубации фаговой суспензией с «Повидон-йодом», предварительно разбавленным в 100000 раз. Как видно из рис. 3, через 6 мин контакта число жизнеспособных вирусов уменьшалось почти на 25%, через 1 ч – дополнительно на 20%. Через 6 ч в суспензии оставалось около 14% жизнеспособных фагов. Инкубация в течение суток приводила к полной утрате их жизнеспособности. Таким образом, при любом исследованном нами времени инкубации «Повидон-йода» с вирусной суспензией наблюдался вирулицидный эффект.

¹ Здесь и далее за 100% принимается жизнеспособность фаговой суспензии без инкубации с «Повидон-йодом» – контроль.

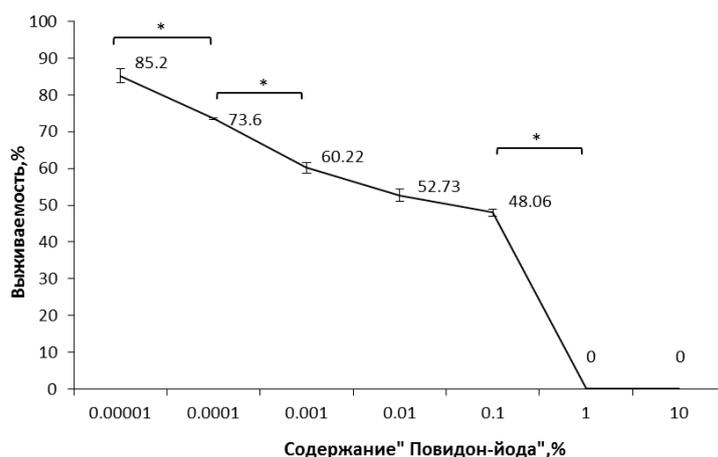


Рис. 1. Зависимость вирулицидного действия «Повидон-йода» от его концентрации ($n = 9$); звездочкой здесь и на остальных рисунках отмечены группы, различающиеся статистически значимо, $p = 0.0083$

Табл. 1

Эффективность действия «Повидон-йода» при разном содержании вирусных частиц. Здесь дано среднее значение \pm стандартная ошибка ($M \pm m$, $n = 10$, $P = 0.95$)

Разведение вирусной суспензии, раз	Содержание «Повидон-йода», %	Число стерильных пятен	Выживаемость, %
Без разведения	0 (контроль)	513.0 ± 4.0	100
	0.1 (опыт)	223.0 ± 8.0	43.5 ± 1.6
10	0 (контроль)	50.6 ± 6.8	100
	0.1 (опыт)	24.6 ± 4.1	48.1 ± 1.5

Основываясь на выборочных параметрах по критерию значимости, выборки с 95%-ной достоверностью отличаются между собой.

Табл. 2

Вирулицидный эффект эндонуклеазы в зависимости от плотности фаговой суспензии

Разведение фаговой суспензии, раз	Вариант	Число стерильных пятен	Выживаемость, %
Без разведения	Контроль	513.0 ± 4.0	100
	Опыт	258.0 ± 9.0	50.3 ± 2.1
10	Контроль	60.3 ± 7.2	100
	Опыт	29.8 ± 4.2	49 ± 1.8

По критерию значимости зависимости между случайными величинами нет.

Исследование зависимости вирулицидного действия от активности эндонуклеазы показало прямую зависимость от активности фермента в интервале 100–100000 ед./мл, как видно из рис. 4. Наилучший вирулицидный эффект был установлен при использовании препарата с активностью 100000 ед./мл.

Так же как и при инкубации с «Повидон-йодом», вирулицидный эффект возрастал с увеличением времени инкубации с эндонуклеазой и достигал 100% при инкубации в течение суток (рис. 5). Таким образом, полученные результаты свидетельствовали о том, что увеличение времени инкубации с препаратом

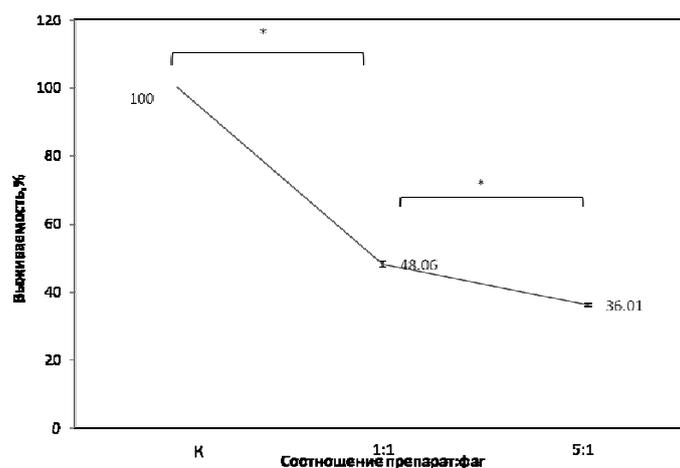


Рис. 2. Действие «Повидон-йода» при разных соотношениях объемов «Повидон-йода» и вирусной суспензии ($n = 12$), $p = 0.016$

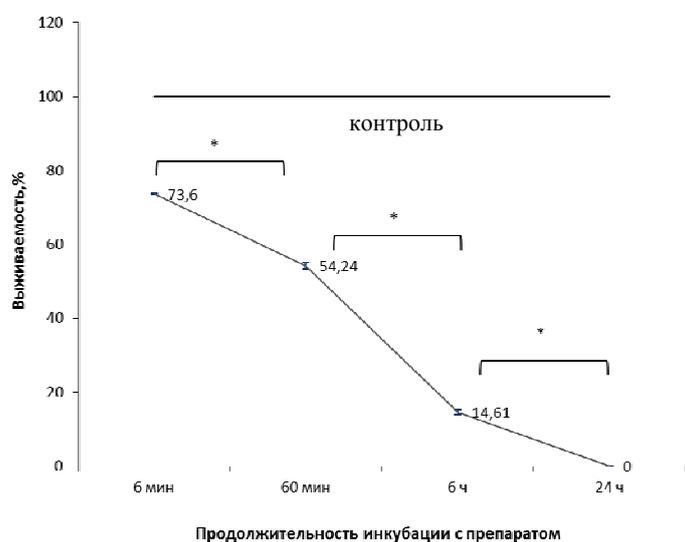


Рис. 3. Зависимость вирулицидного эффекта «Повидон-йода» от времени инкубации ($n = 9$), $p = 0.0125$

положительно влияет на вирулицидное действие эндонуклеазы, хотя необходимо отметить, что значительная утрата жизнеспособности наблюдалась уже через 6 мин инкубации.

Комбинирование «Повидон-йода» с эндонуклеазой существенно улучшило результат. Как видно из рис. 6, при 6-минутной инкубации с комбинированным препаратом выживаемость вирусной суспензии снижается по сравнению с каждым из отдельно взятых препаратов. При этом вирулицидный эффект комбинированного препарата увеличивается на 10% по сравнению с эффективностью эндонуклеазы и на 23% по сравнению с эффективностью «Повидон-йода», что эквивалентно эффекту «Повидон-йода» с содержанием активного вещества, в 100 раз большим, чем в комбинированном препарате.

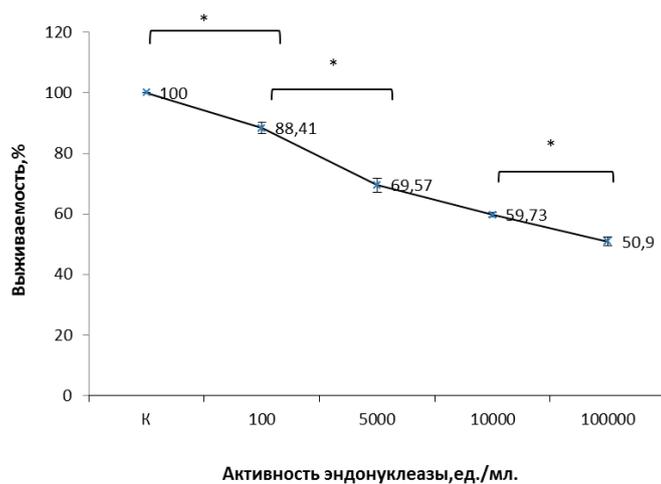


Рис. 4. Зависимость вирулицидного эффекта эндонуклеазы от ее активности ($n = 9$), $p = 0.01$

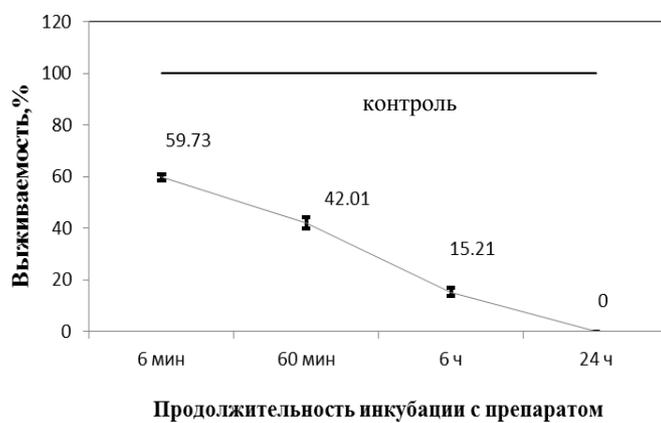


Рис. 5. Зависимость вирулицидного эффекта эндонуклеазы от продолжительности инкубации ($n = 9$), $p = 0.0125$

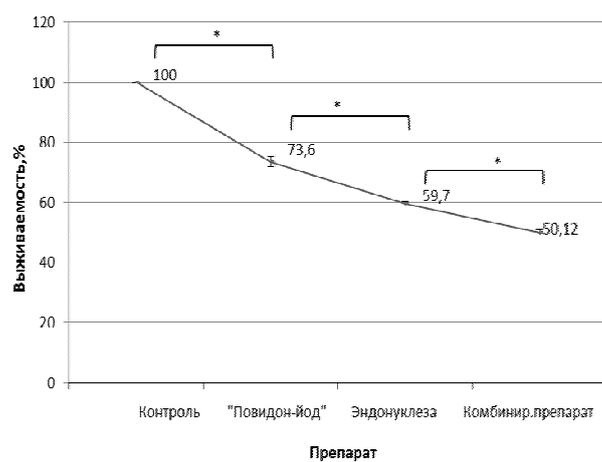


Рис. 6. Вирулицидная активность «Повидон-йода», эндонуклеазы и комбинированного на их основе препарата ($n = 9$), $p = 0.0125$

Таким образом, настоящим исследованием показана перспективность создания комбинированного препарата на основе «Повидон-йода» и эндонуклеазы *Serratia marcescens*, вирулицидная активность которого выше, чем активность каждого из составляющих его препаратов, взятых по отдельности, отличающегося от «Повидон-йода» пониженным окислительным эффектом, что защищено патентом РФ [6].

Литература

1. Скворцова К.Е., Нехорошева А.Г., Гембицкий П.А. Бактерицидные свойства производных гуанидина // Проблемы дезинфекции и стерилизации: Сб. науч. тр. / Под ред. В.И. Вашкова. – М.: ВНИИДиС, 1975. – Вып. 24. – С. 58–62.
2. Zamora J.L. Chemical and microbiologic characteristics and toxicity of povidone-iodine solutions // Am. J. Surg. – 1986. – V. 151, No 3. – P. 400–406.
3. Пат. 2211693 Российская Федерация. Препараты для введения противовоспалительных, особенно антисептических веществ и/или веществ, способствующих заживлению ран, в верхние дыхательные пути и/или ухо / В. Флайшер (DE), К. Раймер (DE), А. Крамер (DE). – № 2000132711/14, заявл. 27.05.99, опубл. 10.09.2003. – URL: http://www.ntpo.com/patents_medicine/medicine_6/medicine_1339.shtml, свободный.
4. Тихомиров А.Л., Лубнин Д.М., Юдаев В.Н. Препарат «Бетадин» в лечении и профилактике воспалительных заболеваний женских половых органов // Гинекология. – 2003. – Т. 5, № 3. – URL: http://old.consilium-medicum.com/media/gynecology/03_03/97.shtml, свободный.
5. PVP-IODINE. Povidone Iodine Antiseptic Agent. – Int. Specialty Products, 2004. – URL: <http://online1.ispcorp.com/Brochures/Pharma/pvpiodine.pdf>, свободный.
6. Пат. 2423136 Российская Федерация. Антивирусный препарат контактного действия на основе «Бетадина» и эндонуклеазы / М.Н. Филимонова, И.А. Рассохина, Э.Ф. Зайнутдинова, Л.Ш. Нигматуллина. – № 200911180/10, заявл. 26.03.2009, опубл. 10.07.2011, Бюл. № 19. – 8 с.
7. Аликин Ю.С., Сенженко Л.П., Клименко В.П. Развитие технологии получения и перспективы использования эндонуклеазы *Serratia marcescens* // Ферменты микроорганизмов: Сб. докл. XI Всерос. конф. – Казань, 1998. – С. 152–163.
8. Куриненко Б.М. Механизмы биологического действия нуклеаз // Лещинская И.Б., Варламов В.П., Куриненко Б.М. Нуклеазы бактерий. – Казань: Казан. гос. ун-т, 1991. – С. 153–154.
9. Лещинская И.Б., Балабан Н.П., Егорова Г.С., Таняшин В.И., Третьяк Т.М. Получение и характеристика высокоочищенного препарата нуклеазы *Serratia marcescens* // Биохимия. – 1974. – Т. 39, Вып. 1 – С. 116–122.
10. Педерсен Ю., Филимонова М.Н., Роенсторф П., Бидерман К. Нуклеаза *Serratia marcescens*. II. Анализ первичных структур путем пептидного картирования в комбинации с плазменно-десорбционной масс-спектрометрией // Биоорг. химия. – 1995. – Т. 21, Вып. 5. – С. 336–344.
11. Филимонова М.Н., Гарусов А.В., Сметанина Т.А., Андреева М.А., Богомольная Л.М., Лещинская И.Б. Изоформы нуклеазы *Serratia marcescens*. Сравнительный анализ субстратной специфичности // Биохимия. – 1996. – Т. 61, Вып. 10. – С. 1800–1806.
12. Franke I., Meiss G., Pingoud A. On the advantage of being a dimer, a case study using the dimeric *Serratia* nuclease and the monomeric nuclease from *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // J. Biol. Chem. – 1999. – V. 274, No 2. – P. 825–832.

13. Miller M.D., Tanner J., Alpaugh M., Benedik M.J., Krause K.L. 2.1 Å structure of *Serratia* endonuclease suggests a mechanism for binding to double-stranded DNA // Nat. Struct. Biol. – 1994. – V. 1, No 7. – P. 461–468.
14. Филимонова М.Н., Дементьев А.А., Лецинская И.Б., Бакулина Г.Ю., Шляпников С.П. Выделение и характеристика изоформ внеклеточной нуклеазы *Serratia marcescens* // Биохимия. – 1991. – Т. 56, Вып. 3. – С. 508–519.

Поступила в редакцию
14.03.13

Зайнутдинова Эльмира Фаритовна – соискатель кафедры микробиологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: *Elechka3@gmail.com*

Рассохина Ирина Олеговна – выпускник кафедры микробиологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

Филимонова Мария Николаевна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры микробиологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: *Maria.Filimonova@ksu.ru*

* * *

ANTIVIRAL EFFECT OF ENDONUCLEASE COMBINED WITH “BETADINE”

E.F. Zainutdinova, I.A. Rassokhina, M.N. Filimonova

Abstract

It is established that the combination of endonuclease from gram negative bacteria *Serratia marcescens* and “Betadine” results in improved antiviral effect compared with that of each individual preparation. The analysis shows that the combination of the preparations leads to an approximately tenfold decrease in the time of achieving the result obtained with each preparation separately. A direct dependence of the virulicidal effect of “Betadine” and the endonuclease on the amount of active substance and the time of incubation with the phage suspension, and the absence of a dependence on the density of the viral suspension were found.

Keywords: *Serratia marcescens*, Povidone-iodine, “Betadine”, endonuclease, antiviral effect.

References

1. Skvortsova K.E., Nekhorosheva A.G., Gembitskii P.A. Antimicrobial properties of guanidine derivatives. *Problemy dezinfektsii i sterilizatsii: Sbornik nauch. trudov (pod red. V.I. Vashkova)* [The Problems of Disinfection and Sterilization: Collection of Sci. Papers (ed. by V.I. Vashkov)]. Moscow, VNIIDiS, 1975, no. 24, pp. 58–62. (In Russian)
2. Zamora J.L. Chemical and microbiologic characteristics and toxicity of povidone-iodine solutions. *Am. J. Surg.*, 1986, vol. 151, no. 3, pp. 400–406.
3. Kramer A., Reimer K., Fleischer W. Medicines for administration of anti-inflammatory, especially antiseptic agents and/or wound-healing substances in the upper airway and/or the ear. Patent RF, no. 2211693, 2003. Available at: http://www.ntpo.com/patents_medicine/medicine_6/medicine_1339.shtml. (In Russian)
4. Tikhomirov A.L., Lubnin D.M., Yudaev V.N. “Betadine” drug in the treatment and prevention of inflammatory diseases of the female genital organs. *Gynaecology*, 2003, vol. 5, no. 3. Available at: http://old.consilium-medicum.com/media/gynecology/03_03/97.shtml.
5. PVP-IODINE. Povidone Iodine Antiseptic Agent. Int. Specialty Products, 2004. Available at: <http://online1.ispcorp.com/Brochures/Pharma/pvpiodine.pdf>.

6. Filimonova M.N., Rassokhina I.A., Zainutdinova E.F., Nigmatullina L.Sh. An antiviral drug of contact action based on "Betadine" and endonuclease. Patent RF, no. 2423136, 2009. (In Russian)
7. Alikin Yu.S., Senzhenko L.P., Klimenko V.P. Development of technology and application potential of *Serratia marcescens* endonuclease. *Fermenty mikroorganizmov: Sb. dokl. XI Vseross. konf.* [Enzymes of Microorganisms: Proc. XI All-Russian Conf.]. Kazan, 1998, pp. 152–163. (In Russian)
8. Kurinenko B.M. Mechanisms of the biological action of nucleases. Leschinskaya I.B., Varlamov V.P., Kurinenko B.M. *Nukleazy bakterii* [Bacterial Nucleases]. Kazan, Kazan. Gos. Univ., 1991, pp. 153–154. (In Russian)
9. Leshchinskaya I.B., Balaban N.P., Egorova G.S., Tanyashin V.I., Tretyak T.M. Production and characteristics of a highly purified preparation of *Serratia marcescens* nuclease. *Biokhim.*, 1974, vol. 39, no. 1, pp. 116–122. (In Russian)
10. Pedersen Yu., Filimonova M.N., Roepstorf P., Biderman K. *Serratia marcescens* nuclease. II. Analysis of the primary structures by peptide mapping combined with plasma desorption mass spectrometry. *Bioorg. Khim.*, 1995, vol. 21, no. 5, pp. 336–344. (In Russian)
11. Filimonova M.N., Garusov A.V., Smetanina T.A., Andreeva M.A., Bogomolnaya L.M., Leshchinskaya I.B. Isoforms of *Serratia marcescens* nuclease. Comparative analysis of the substrate specificity. *Biokhim.*, 1996, vol. 61, no. 10, pp. 1800–1806. (In Russian)
12. Franke I., Meiss G., Pingoud A. On the advantage of being a dimer, a case study using the dimeric *Serratia* nuclease and the monomeric nuclease from *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, no. 2, pp. 825–832.
13. Miller M.D., Tanner J., Alpaugh M., Benedik M.J., Krause K.L. The structure of *Serratia* endonuclease suggest a mechanism for binding to double-stranded DNA. *Nat. Struct. Biol.*, 1994, vol. 1, no. 7, pp. 461–468.
14. Filimonova M.N., Dementev A.A., Leshchinskaya I.B., Bakulina G.Yu., Shlyapnikov S.P. Isolation and characteristics of the isoforms of extracellular *Serratia marcescens* nuclease. *Biokhim.*, 1991, vol. 56, no. 3, pp. 508–519. (In Russian)

Received
March 14, 2013

Zainutdinova Elmira Faritovna – External PhD Student, Department of Microbiology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: Elechka3@gmail.com

Rassokhina Irina Olegovna – Graduate, Department of Microbiology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

Filimonova Mariya Nikolaevna – Doctor of Biology, Leading Research Fellow, Department of Microbiology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: Maria.Filimonova@ksu.ru