

## НОВЫЙ ИММУНОМОДУЛЯТОР ИЗ ТРИХОДЕРМЫ

С.Б. АЛЕКСЕЕВ, И.П. СМЕРНОВА, Т.Т. БЕРЕЗОВ

Кафедра биохимии Российского Университета дружбы народов

Представлены доказательства иммуномодулирующего действия белка из *Trichoderma harzianum*. Белок-иммуномодулятор не токсичен в концентрациях 70 - 0,7 нг/мл и может быть использован в качестве субстанции препарата с иммуномодулирующей активностью.

**Ключевые слова:** Триходерма, иммуномодулятор, L-лизин-а-оксидаза,

L-лизин-а-оксидаза гриба Триходермы отличается от других известных противоопухолевых ферментных препаратов микробного происхождения рядом свойств; в частности фермент наделен высокой каталитической активностью и высокой специфичностью действия по отношению к L-лизу, а также высоким сродством к субстрату [1].

На кафедре биохимии Российского Университета дружбы народов в течение ряда лет были проведены систематические исследования с целью определения оптимальных условий биосинтеза L-лизин-а-оксидазы (ЛО) в клетках Триходермы [2,3], выделения, очистки и некоторых химических и каталитических свойств фермента [4-6]; были предприняты также исследования его противолейкозной активности, антиинвазивного и антиметастатического действия в опытах *in vitro* и *in vivo* [7-9].

В последние годы были продолжены исследования ряда других биологических свойств фермента; в частности изучены его иммуномоделирующие свойства.

Целью настоящей работы было исследование иммуномодулирующих свойств белка Триходермы (ЛО) и определению его цитотоксического действия.

Методика исследования: В опытах использовали продуцент L-лизин-а-оксидазы *Trichoderma harzianum* Rifai, выращенный по описанному ранее методу [10]. Активность ЛО определяли спектрофотометрически ортоданизидиновым микрометодом [11]. Выделение и очистку белка фермента осуществляли ранее разработанным методом [4]. В опытах использовали ЛО с активностью 70 нг/мл. Оценку иммуномодулирующей активности белка проводили на модели эндогенного колониеобразования поверхности селезенки мышей линии F/CBA C157B1 после введения белка по методу, описанному в монографии Петрова Р.В., Хаитова Р.М. [5]. Животным внутривенно двукратно вводили белок в дозе 0,5 мг. На третий день животных облучали дозой 600 Р (рентген) на аппарате РУМ-17. После облучения препарат вводили еще три раза в той же дозе. В эксперименте животных распределяли на четыре группы:

- 1 - облученные животные, не иммунизированные белком;
- 2 - облученные животные, иммунизированные белком;
- 3 - облученные животные, которым введены клетки лимфоузлов родительского генотипа;
- 4 - облученные животные, которым введены клетки лимфоузлов родительского генотипа одновременно с введением препарата белка ЛО.

Доза лимфоцитов мышей СВА, вызывающая 50% инактивацию колониеобразующих клеток (КОЕ) составила  $1 \times 10^6$  клеток. На 9 суток мышей забивали, удаляли селезенки и после фиксации подсчитывали число колоний на поверхности органа. Клетки линии МТ-4 (лимфобластоидная клеточная линия человека, культивируемая *in vitro*) выращивали на среде RPM1-1640, содержащей 10% фетальной сыворотки теленка и 100 ед/мл ампицилина. Подсчет клеток проводили в камере Горяева. Определение количества мертвых клеток с помощью окрашивания клеток трипановым синим. За скоростью синтеза ДНК следили по включению в кислотонерастворимую фракцию 3Н-тимидина. Конечная концентрация метки составляла 5 мкКю/мл. После 1 часа инкубации с меченым предшественником к осадку клеток МТ-4 ( $1 \times 10^6$ ) добавляли 5% трихлоруксусную кислоту, охлажденную до  $-45^{\circ}\text{C}$ ; промывали осадок 3 раза холодной кислотой и затем осадок растворяли в 1 мл 0,1 н NaOH. На фильтры для подсчета радиоактивности наносили по 0,1 мл образца. Радиоактивность образцов регистрировали на спектрометре в толуоловом сцинтиляторе (10 мл) в течение 1 мин.

Результаты исследования: В таблице 1 представлены результаты определения иммуномодулирующей активности белка из Триходермы. Видно, что введение препарата вызывает достоверную стимуляцию колониеобразующих клеток КОЕ более чем в два раза, что свидетельствует о наличии выраженных иммуномодулирующих свойств белка. Видно также, что иммуномодулирующая активность белка сохраняется и в опыте с ингибированием процесса эндогенного колониеобразования клетками лимфоузлов родительского генотипа. Разница между опытом и контролем составляет 181%. Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследуемый белок наделен иммуномодулирующей активностью.

Таблица 1

Стимуляция белком *Trichoderma harzianum* Rifai образования эндогенных колоний

Варианты опыта	Среднее число эндогенных колоний на селезенку сублетарно облученных мышей после введения белка	Среднее число эндогенных колоний сублетарно облученных мышей после введения $1 \times 10^6$ лимфоцитов родительского генотипа и белка	P
1. Контроль (физраствор)	$12,18 \pm 2,76$	$3,8 \pm 0,53$	$>0,05$
2. Препарат белка	$30,9 \pm 4,6$	$6,9 \pm 1,22$	



Однако полученные результаты по изучению стимуляции белком образования эндогенных колоний не исключали возможности того, что белок не будет обладать способностью эндогенной стимуляции клеток, культивируемых *in vitro*. С этой целью был проведен анализ стимуляции белком Триходермы репликативного синтеза использованных в работе лимфобластоидных клеток линии МТ-4, которые, как известно, обладают собственным высоким репликативным потенциалом.

Результаты по изучению скорости синтеза ДНК по включению меченого тимидина на разных стадиях роста клеток представлены на рисунке. Видно, что через 2 дня роста культуры белок стимулирует репликативный синтез клеток незначительно, что объясняется собственной высокой скоростью деления клеток. 3-й день характеризуется уже заметной разницей в скорости синтеза ДНК между опытными и контрольными культурами. К 7-му дню роста в присутствии белка интенсивность биосинтеза ДНК более чем в 2 раза превышает контрольный уровень.

Таблица 2

Определение цитотоксического действия различных концентраций белка-иммуномодулятора из Триходермы на клетки МТ-4

Концентрация белка-иммуномодулятор (нг/мл)	700	70	7	0,7
Цитотоксичность белка	умерен. токсич.	не токсич.	не токсич.	не токсич.

Таким образом, белок из *Trichoderma harzianum* Rifai проявляет иммуномодулирующую активность как на моделях *in vivo*, так и *in vitro*.

В последующих опытах было интересно выяснить токсичен ли белок Триходермы в испытываемых концентрациях в качестве иммуномодулятора. Результаты исследований представлены в Таблице 2.

Из Таблицы 2 видно, что белок-иммуномодулятор из *Trichoderma harzianum* Rifai не токсичен в пределах концентраций 70 - 0,7 нг/мл и может быть использован в качестве субстанции препарата с иммуномодулирующей активностью.

## ЛИТЕРАТУРА

- 1 Березов Т.Т. // Вестн. АМН СССР.- 1984.- N.8.- С.11-24.
- 2 Смирнова И.П., Хадуев С.Х. // Микробиология.- 1984.- N.1.- С.163-164.
- 3 Смирнова И.П. // Биотехнология.- 1991.- N.3.- С.3-7.
- 4 Янкевич Н.Б., Лаугалене Н.Ф., Веса В.С. и др. // Вопр. мед. химии.- 1989.- N.2.- С.84-86.
- 5 Жуковский А.П., Лукашева Е.В., Березов Т.Т. и др. // Вестник ЛГУ.- 1991.- N.4.- С.82-85.
- 6 Лукашева Е.В., Веса В.С., Корпела Т.К., Березов Т.Т. // Биохимия.- 1992.- Т.57,- вып.3.- С.452-455.
- 7 Хадуев С.Х., Глазкова Т.Ю., Веса В.С. и др. // Бюлл. exper. биологии и медицины.- 1989.- N.10.- С.476-477.
- 8 Хадуев С.Х., Уманский В.Ю., Веса В.С. и др. // Бюлл. exper. биологии и медицины.- 1991.- N.10.- С.419-422.
- 9 Хадуев С.Х., Уманский В.Ю., Залюк С.П. и др. // Бюлл. exper. биологии и медицины.- 1990.- N.5.- С.458-459.



10. *Kusakabe H., Kodata K., Kuninaka A. et al. // Agri-cult. biol. chem.*- 1979.- Vol.43.- P.2531-2535.
11. *Смирнова И.П., Сяткин С.П., Березов Т.Т. // Вопр. мед. химии.*- 1984.- Т.30, вып.1.- С.133-136.
12. *Петров Р.В., Хаитов Р.М.// Контроль и регуляция им-мунного ответа.*- Л.,- 1981.- С.310-311.

## NEW IMMUNOMODULATOR FROM TRICHODERMA

*S.B. Alekseev, I.P. Smirnova, T.T. Berezov*

Russian Peoples' Friendship University, Moscow

Evidences on the immunomodulator effect of protein from *Trichoderma harzianum* R. are presented. Protein immunomodulator showed no toxicity with concentrations: 70 - 0,7 ng/ml and this protein will be used as substance of gent with immunomodulator activity.