

УДК 577.15

©Коллектив авторов

ТРИХОДЕРМА – ПРОДУЦЕНТ ИНГИБИТОРА ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА.

СМИРНОВА И.П., АЛЕКСЕЕВ С.Б., МОШКОВ Д.А.

Кафедра биохимии Российского Университета дружбы народов

Сопоставлено ингибиторное действие белка из триходермы и азидотимидина на репродукцию вируса СПИДа. Полученные данные свидетельствуют о том, что белок из триходермы может служить ингибитором вируса СПИДа.

Ключевые слова: L-лизин- α -оксидаза, вирус иммунодефицита человека, триходерма.

В настоящее время поиск средств лечения самого опасного заболевания человека – СПИД,- является первоочередной задачей многих исследований. Испытания на возможность ингибировать вирус иммунодефицита человека проводятся с веществами самого разнообразного строения, в том числе и с веществами микробного происхождения [1-4].

В связи с этим представляло интерес исследовать изученный ранее штамм *Trichoderma harzianum* Rifai – продуцент антиопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы [5] на способность ингибировать репродукцию вируса иммунодефицита человека и сравнить продукт биосинтеза этого гриба на противовирусную активность с широко используемым в качестве ингибитора ВИЧ азидотимидином [6].

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ. В работе использовали штамм *Trichoderma harzianum* Rifai, выращенный по описанному ранее методу [7]. Гомогенный (по данным гель-электрофореза и ультрацентрифугирования) фермент штамма триходермы L-лизин- α -оксидаза с удельной активностью 81 Е/мг был получен ранее разработанным нами способом [8]. Определение активности фермента из триходермы проводили спектрофотометрическим ортодианизидиновым микрометодом [9]. Клетки линии МТ-4 (культивируемые Т-лимфоциты человека), клетки линии *Jurkat* (лимфобластоидная линия

человека) выращивали на среде RPMI-1640, содержащий 10% сыворотки теленка и 100 ед./мл ампициллина. Подсчет клеток проводили в камере Горяева, определяя количество мертвых клеток с помощью окрашивания трипановым синим. Заражение клеток ВИЧ осуществляли следующим образом: вирус (штамм ШВ/Н9) вносили в суспензию клеток МТ-4 в количестве 100,000 цитопатических доз (ЦПД) на 500,000 клеток. За размножением вируса следили по наличию в культуральной среде вирусных антигенов и развитию динамики цитопатического действия вируса на клетки. Стандартным считали наличие мертвых клеток в контроле не более 5%. В клетках, зараженных вирусом, ЦПД отмечали при наличии не менее 10% мертвых клеток. Присутствие в культуральной среде вирусных антигенов определяли с помощью сыворотки крови больного СПИД. Сыворотка содержала антитела против продукта гена *gag* белка р24 и продуктов гена *env* *gp41* и *gp120* вируса иммунодефицита человека I типа. Иммуноглобулины выделяли из сыворотки на сорбенте DEAE-Affi-Gel Blue в соответствии с прилагаемой инструкцией фирмы Bio-Rad (США). Часть выделенных IgG конъюгировали с пероксидазой хрена периодатным методом по стандартной методике. Титр конъюгата определяли по оптической плотности при 492 НМ в результате протекания цветной ферментативной реакции в растворе следующего состава: 10 мг *o*-фенилендиамина в 24 мл 0,1 М фосфатно-цитратного буфера рН 5,0 и 10 мкл перекиси водорода (33%). В лунку вносили 100 мкл раствора и через 10 мин реакцию останавливали 100 мкл 2М серной кислоты. За титр конъюгата принимали такое разведение, при котором оптическая плотность составляла 1,2 оптические единицы, что соответствовало разведению конъюгата 1:800. Сорбирование иммуноглобулинов в ячейки 96-луночного планшета производили по 1 мкг в 0,05 М карбонат-бикарбонатном буфере рН 9,6 в течении 18 часов. Далее в лунки вносили 100 мкг испытуемого образца, приготовленного следующим образом: культурную среду клеток МТ-4, зараженных вирусом, разводили в 3 раза в натрий-фосфатном буфере рН 7,0, содержащем 0,1 М NaCl, 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 0,5% Твин-40. После часовой инкубации планшеты промывали 3 раза тем же буфером без БСА, инкубировали с конъюгатом в течении 1 часа и окрашивали как описано выше. За титр принимали такое разведение, при котором оптическая плотность в лунке была в 3 раза выше чем в соответствующем контроле (культурная среда клеток МТ-4, незараженных вирусом).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. Предварительно определяли токсическую дозу белка триходермы для клеток МТ-4. Сравнение проводили со стандартным препаратом – азидотимидином, который вызывает подавление репродукции вируса в концентрации 3 мкМ (1,2 мкг/мл).

Данные, приведенные в таблице 1, свидетельствуют, что нетоксическая доза фермента находится в диапазоне концентраций 0,7-70 нг/мл.

Азидотимидин вызывает полное подавление репродукции вируса в дозе 1,2 мкг/мл. Такой же эффект достигается при применении белка триходермы в концентрациях от 7,0 до 70 нг/мл. При более низких концентрациях белка видно, что наблюдается частичное уменьшение титра вируса по сравнению с контрольными культурами.

Таблица 1. Сравнительное определение цитотоксичности белка из триходермы и азидотимидина.

Исследуемое вещество	Концентрация	Токсическое действие
Азидотимидин	1,2 мкг/мл	не токсичен
Белок триходермы	700 нг/мл *	ум. токсичен
	70 нг/мл	не токсичен
	7,0 нг/мл	не токсичен
	0,7 нг/мл	не токсичен

Таблица 2. Антивирусная активность белка из триходермы.

Доза заражения	Дни учета	Титр вируса в культуральной среде по ЦПД в мл				
		Азидотимидин (1,2 мкг/мл)	Белок триходермы (нг/мл)			
			70	7,0	0,7	Контроль (без белка)
100 тыс. ЦПД/50 на мл	1	- (*)	-	-	100	1.000
	2	-	-	-	1.000	10.000
	3	-	-	-	1.000	100.000
	4	-	-	-	1.000	1.000.000

(*) – вирус не определяется.

Результаты исследования антивирусного действия белка триходермы представлены в таблице 2.

Таким образом, высокоочищенный белок *Trichoderma harzianum* Rifai в концентрациях 7,0 – 70 нг/мл полностью блокирует репродукцию ВИЧ, не оказывая токсического воздействия на клетки МТ-4.

Можно также отметить, что для достижения при использовании белка триходермы антивирусного действия требуется гораздо более низкие концентрации по сравнению с азидотимидином. Полученные данные антивирусной активности белка триходермы были подтверждены в экспериментах по изучению его воздействия на синтез вирусных антигенов в зараженных клетках. Результаты иммуноферментного тестирования вирусных антигенов при наличии и отсутствии ингибитора представлены в таблице 3.

Таблица 3. Сравнение влияния азидотимидина и белка триходермы на синтез вирусных антигенов, выявляемых в культуральной среде зараженных вирусом клеток МТ-4.

Доза заражения	Дни учета	Титр вирусного антигена в культуральной среде по ИФА				
		Азидотимидин (1,2 мкг/мл)	Белок триходермы (нг/мл)			Контроль (без белка)
			70	7,0	0,7	
100 тыс. ЦПД/50 на мл	1	1:9	1:3	1:3	1:9	1:81
	2	1:9	1:9	1:3	1:81	1:243
	3	1:81	1:9	1:81	1:243	1:729
	4	1:81	1:9	1:81	1:243	1:729

Данные, представленные в таблицах 2 и 3, позволяют сделать вывод, что белок, выделенный из *Trichoderma harzianum Rifai* ингибирует как репродукцию вируса иммунодефицита человека, так и синтез вирусных антигенов и могут представлять интерес в дальнейших научных исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Quinn T.C. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 2407-2414.
2. Wasserheit J.N. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 2430-2435.
3. Березов Т.Т., Алексеев С.Б., Смирнова И.П., и др. (1994) Патент РФ № 2022011.
4. IX-th International Congress of Virology. Part. 26 Chemotherapy (1993) Glasgow. – Abstracts. 203-210.
5. Хадуев С.Х., Глазкова Т.Ю., Веса В.С., и др. (1989) Бюл. exper. биол. мед. № 10, 476-477.
6. Mitsuya M., Broder S., et. al. (1987) Nature, **325**, 773-778.
7. Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A., et. al. (1979) Agricult. Biol. Chem., **43**, 2531-2535.
8. Хадуев С.Х., Лукашева Е.А., Смирнова И.П., Березов Т.Т. (1985) Вопр. мед. химии, **31** (5), 130-134.
9. Смирнова И.П., Сяткин С.П., Березов Т.Т. (1984) Вопр. мед. химии, **30** (1), 133-136.

Поступила 18.06.97.

TRICHODERMA RIFAI AS HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS INHIBITOR PRODUCER.

I.P. SMIRNOVA, S.B. ALEXEEV, D.A. MOSHKOFF

Department of Biochemistry, Peoples Friends hip University, Moscow

The ability of protein isolated from (*Trichoderma Rifai*) and azydothymidine to inhibit the reproduction of HIV-virus was compared. The obtained experimental data have verified that *Trichoderma Rifai* protein is a promising human immunodeficiency virus (HIV) inhibitor.

Key words: Human immunodeficiency virus, *Trichoderma*.