

Исследование противоопухолевой субстанции из триходермы

В. М. ПОДБОРОНОВ¹, А. Е. КУЗОВНИКОВ², А. К. ЗАЙЦЕВА², И. П. СМЕРНОВА², Т. Т. БЕРЁЗОВ²

¹ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи РАМН, Москва

² Российский университет дружбы народов, Москва

Investigation of Antitumor Substance from *Trichoderma*

V. M. PODBORONOV, A. E. KUZOVNIKOV, A. K. ZAITSEV, I. P. SMIRNOVA, T. T. BEREZOV

N.F.Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow
Russian University of the People's Friendship, Moscow

Изучено влияние L-лизин- α -оксидазы из гриба триходерма на функциональную активность Т-лимфоцитов. Установлено, что L-лизин- α -оксидаза в дозе 35 ЕД/кг, введенная парентерально, не оказывает супрессивного действия на функциональную активность Т-лимфоцитов. Выявлено подавляющее действие фермента на некоторые показатели функциональной активности макрофагов. Показано, что L-лизин- α -оксидаза проявляет избирательное лимфотропное действие и не обладает митостатической активностью, что выгодно отличает данный препарат от других противоопухолевых средств.

Ключевые слова: L-лизин- α -оксидаза, триходерма, Т-лимфоциты.

The effect of L-lysine- α -oxidase from *Trichoderma harzianum* Rifai on the functional activity of T-lymphocytes was investigated. It was shown that in a dose of 35 units/kg administered parentally the enzyme had no suppressive effect on the T-lymphocyte functional activity. An inhibitory effect of L-lysine- α -oxidase on some indices of the macrophages functional activity was observed. L-Lysine- α -oxidase had a selective lymphotropic action and showed no mytostatic activity, which is in favour of the enzyme vs. other antitumor agents.

Key words: L-lysine- α -oxidase, *Trichoderma*, T-lymphocytes.

Противоопухолевый фермент L-лизин- α -оксидаза (КФ 1.4.3.) в течение ряда лет исследуется на кафедре биохимии Российского университета дружбы народов. Работами многих авторов показано, что фермент полифункционален и может быть исходной субстанцией для создания лекарственных препаратов разной терапевтической направленности [1–10].

Нами продолжены некоторые доклинические испытания новой субстанции L-лизин- α -оксидазы [11].

Целью настоящей работы стало изучение влияния L-лизин- α -оксидазы из *Trichoderma harzianum* Rifai на функциональную активность Т-лимфоцитов при парентеральном введении в дозе 35 ЕД/кг. Весьма интересным представлялось исследование митостатической активности фермента и некоторых других его биологических характеристик.

Материал и методы

Удельную активность фермента выражали числом единиц активности на 1 мг белка или 1 мл раствора препарата. Белок определяли по методу Лоури [10]. В качестве стандарта ис-

пользовали 0,05% раствор кристаллического бычьего альбумина («Reanal», Венгрия). L-лизин- α -оксидаза исследовалась в концентрациях от 3,5 ЕД/мл до $3,5 \times 10^{-4}$ ЕД/мл на мышах линии СВА и линии SHR, массой 18–20 г.

Митогенное и комитогенное действие препарата изучали, используя поликлональный активатор Т-лимфоцитов — конкавалин А (Кон А) в оптимальной (1,25 мкг/мл) и субоптимальной (0,625 мкг/мл) концентрациях.

Культивирование проводили в среде RPMI 1640 («Flow Labs», Великобритания), содержащей 10% инактивированной (56°C, 30 мин) эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) («Serva», США), 2 мМ L-глутамин («Flow Labs», Великобритания), 20 мМ HEPES («Flow Labs», Великобритания), 5×10^{-5} М 2-меркаптоэтанол («Merck», Германия) и 50 мкг/мл гентамицина.

Клетки культивировали в полистироловых круглодонных микропланшетах в объеме 200 мкл в атмосфере абсолютной влажности с 7,5% CO₂ в воздухе в течение 72 ч. За 16–18 ч до окончания культивирования в культуры вносили по 0,5 мкКи ³H-тимидина. Клетки собирали на мембранные фильтры, обрабатывали 0,15 М HCl, 7% ТХУ, 96% этанолом и высушивали в течение 1,5 ч при 60°C. Фильтры с клетками помещали в сцинтилляционные флаконы со сцинтиллятором (PPO-POPOP-толуол) и определяли радиоактивность в жидкостном сцинтилляционном счётчике SL-4000 («Roche Bioelectronique», Франция). Результаты выражали в имп/мин.

Результаты и обсуждение

Результаты изучения влияния L-лизин- α -оксидазы в опытах *in vitro* на функциональную активность Т-системы иммунитета, определяемой спонтанной и митогениндуцирующей пролиферацией лимфоцитов представлены в табл. 1.

© Коллектив авторов, 2011

Адрес для корреспонденции:

Таблица 1. Митогенная и комитогенная (Кон А) активность L-лизин- α -оксидазы

Концентрация препарата в культуре, ЕД/мл	Концентрация Кон А* в культуре, мкг/мл	Включение ^3H -тимидина, имп/мин./ $M \pm m$	p
$3,5 \cdot 10^{-4}$	—	697 ± 115	$<0,001^*$
$3,5 \cdot 10^{-4}$	0,625	8473 ± 1242	$>0,05^{**}$
$3,5 \cdot 10^{-4}$	1,25	13784 ± 1417	$>0,05^{***}$
$3,5 \cdot 10^{-3}$	—	54 ± 5	$<0,001^*$
$3,5 \cdot 10^{-3}$	0,625	55 ± 5	$<0,001^{**}$
$3,5 \cdot 10^{-3}$	1,25	46 ± 2	$<0,001^{***}$
$3,5 \cdot 10^{-2}$	—	72 ± 15	$<0,001^*$
$3,5 \cdot 10^{-2}$	0,625	55 ± 4	$<0,001^{**}$
$3,5 \cdot 10^{-2}$	1,25	46 ± 4	$<0,001^{***}$
$3,5 \cdot 10^{-1}$	—	58 ± 9	$<0,001^*$
$3,5 \cdot 10^{-1}$	0,625	37 ± 3	$<0,001^{**}$
$3,5 \cdot 10^{-1}$	1,25	53 ± 5	$<0,001^{***}$
3,5	—	45 ± 3	$<0,001^*$
3,5	0,625	54 ± 4	$<0,001^{**}$
3,5	1,25	62 ± 5	$<0,001^{***}$
—	—	1754 ± 131	—
—	0,625	8802 ± 950	—
—	1,25	14885 ± 916	—

Примечание. p^* — уровень значимости различий приведён в сравнении с контролем (без Кон А и препарата); p^{**} — уровень значимости различий приведён в сравнении с контролем (0,625 мкг/мл Кон А без препарата); p^{***} — уровень значимости различий приведён в сравнении с контролем (1,25 мкг/мл Кон А без препарата).

Таблица 2. Влияние введения L-лизин- α -оксидазы экспериментальным животным на функциональную активность Т-лимфоцитов

Группа животных	Концентрация Кон А в культуре, мкг/мл		
	0	0,625	1,25
Контроль, $n=2$	$2981 \pm 154^*$	12326 ± 245	22143 ± 2213
Опыт, $n=7$	2852 ± 201	12087 ± 646	22373 ± 1020
p	$>0,5$	$>0,5$	$>0,5$

Примечание. * — включение ^3H -тимидина, имп/мин.

Как видно из представленных результатов, во всех испытанных концентрациях препарат фермента не обладал собственной митогенной активностью. Более того, почти во всех случаях он полностью подавлял пролиферацию спленоцитов в культуре и лишь при использовании препарата L-лизин- α -оксидазы в концентрации, эквивалентной 0,01 терапевтической дозы ($3,5 \times 10^{-4}$ ЕД/мл) уровень включения метки составлял приблизительно 40% от контроля (культивирование без препарата).

L-лизин- α -оксидаза не обладает также и митогенным действием в отношении Т-лимфоцитов, стимулированных Кон А. Напротив, при использовании митогена в субоптимальной и оптимальной концентрациях наблюдалась та же зависимость от использованной концентрации препарата, как и в случае спонтанной пролиферации, т. е. препарат фермента полностью отменял митогениндуцированную бласттрансформацию в концентрациях эквивалентных 100; 10; 1 и 0,1 терапевтической дозы (35 ЕД/кг). При использовании препарата в наименьшей из взятых в опыт концентраций ($3,5 \times 10^{-4}$ ЕД/мл) статистических значимых различий между опытом и контролем не наблюдалось.

Полученный нами результат показывает, что L-лизин- α -оксидаза обладает способностью отменять обусловленную митогеном стимуляцию лимфоцитов. При этом необходимо учитывать возможность прямого действия фермента на аминокислоту лизин, являющуюся, как известно, незаменимой аминокислотой и входящей в состав питательной среды для культивирования клеток. Именно недостаток лизина, а возможно и действие перекиси водорода, образующегося в результате ферментативной реакции, в процессе культивирования клеток могли быть причиной отсутствия пролиферации последних.

Учитывая ингибирующее действие фермента на пролиферацию лимфоцитов в культуре клеток, были проведены эксперименты *in vivo* по изучению действия L-лизин- α -оксидазы на некоторые показатели функциональной активности Т-лимфоцитов экспериментальных животных.

Результаты изучения влияния L-лизин- α -оксидазы на функциональную активность системы клеточного иммунитета (Т-лимфоцитов) представлены в табл. 2. Как видно из представленных исследований, введение препарата экспериментальным животным не оказывает влияние на спо-

Таблица 3. Влияние L-лизин- α -оксидазы на активность 5'-нуклеотидазы перитонеальных макрофагов мышей линии СВА

№ опыта	№ варианта	Препарат	Кол-во животных в группе	Кол-во мкг фосфора на 10 клеток, мкг Р ($M \pm m$)	p^*	% от контроля
Опыт 1	1.	Контроль	$n=9$	$79,43 \pm 2,49$	—	100
	2.	L-лизин- α -оксидаза	$n=10$	$90,88 \pm 1,44$	$<0,05$	114,41
Опыт 2	1.	Контроль	$n=9$	$39,42 \pm 1,73$	—	100
	2.	L-лизин- α -оксидаза	$n=10$	$45,36 \pm 2,78$	$<0,05$	115,27

Примечание. p^* — дано в сравнении с соответствующими контролями. Нативный фермент вводили в дозе Ед/кг внутривенно, пятикратно. Опыты 1, 2 выполнены в разное время на животных разного привоза. Контроль — введение животным физиологического раствора.

Таблица 4. Оценка митостатической и лимфотоксической активности нативной L-лизин- α -оксидазы

Доза препарата, Ед/кг $\cdot$ 5*	Среднее число эндогенных колоний на селезёнку сублетально облучённых мышей, после введения препарата	Ингибирование КОЕ, %/ митостатический эффект	p	Среднее число эндогенных колоний сублетально облучённых мышей после введения 10^6 лимфоцитов и препарата	p	Выживание КОЕ, %/ лимфотоксический эффект
Контроль физ. раствор	$12,18 \pm 2,75$	—	—	$3,8 \pm 0,53$	—	6,5
L-лизин- α -оксидаза	$30,9 \pm 5,2$	отсутствует	$>0,05$	$6,9 \pm 2,22$	—	52

Примечание. * — пятикратное введение препарата и физраствора (контроль) в указанной дозе. p — даны в сравнении с контролем.

способность их лимфоцитов к спонтанной и митоген-индуцированной бласттрансформации. Показатели в контрольной (животные, не получавшие препарат) и опытной группах практически не отличались между собой.

Таким образом, нами показано, что парентеральное трёхкратное введение экспериментальным животным препарата L-лизин- α -оксидазы в разовой дозе 35 Ед/кг массы тела не приводило к нарушениям функциональной активности Т-системы, определяемой по спонтанной и митогениндуцированной бласттрансформации Т-лимфоцитов.

Учитывая важную роль функционального состояния макрофагов в формировании специфических реакций иммунитета и неспецифической резистентности организма, было изучено влияние противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы на активность эктоплазматического фермента клеточной стенки перитонеальных макрофагов 5'-нуклеотидазы.

Результаты определения активности фермента при введении нативной L-лизин- α -оксидазы мышам линии СВА в дозе 35 Ед/кг внутривенно, пятикратно, показали, что исследуемый препарат достоверно повышал активность маркёрного фермента 5'-нуклеотидазы (табл. 3), что свидетельствует о супрессивном влиянии L-лизин- α -оксидазы на функцию макрофагов.

Нам представлялось целесообразным провести изучение влияния L-лизин- α -оксидазы на фагоцитарную активность макрофагов.

Результаты экспериментов, проводимые на мышцах линии SHR, при которых вводили L-лизин- α -оксидазу, однократно, внутривенно в дозе 35 Ед/кг показали, что препарат не оказывает супрессивного действия на систему мононук-

леарных фагоцитов. Клиренс угла контроля составлял $0,027 \pm 4,3 \times 10^{-3}$, а при введении L-лизин- α -оксидазы $0,22 \pm 1,43 \times 10^{-3}$, при $p 0,05$.

Отсутствие влияния противоопухолевого препарата на систему мононуклеарных фагоцитов является положительным качеством препарата.

В дальнейших экспериментах нами была проведена оценка митостатического и лимфостатического действия L-лизин- α -оксидазы на модели реакции трансплантат против хозяина (РТПХ). Результаты полученных экспериментов отражены в табл. 4.

Анализ данных табл. 4 показывает, что сублетальное облучение животных F_1 (СВА $\cdot$ С₅₇В₁) приводило к миграции стволовых клеток из костного мозга. Введение физиологического раствора (контрольные животные) не приводило к ингибированию КОЕ. Введение L-лизин- α -оксидазы вызывало достоверную стимуляцию величины КОЕ на 134%, что указывает на полное отсутствие митостатического действия. Анализ результатов оценки митостатической активности различных цитостатиков показал, что для ряда препаратов (циклофосфан) показатель ингибирования КОЕ составлял 80%. Наряду с этим, в данном тесте удалось выявить лимфотоксическое действие препарата.

Заключение

Изучение влияния L-лизин- α -оксидазы из гриба Триходерма позволило выявить избирательный лимфотоксический эффект на Т-лимфоциты составлял 53%. Учитывая, что в ряде тестов выявлено иммуномодулирующее действие L-лизин- α -оксидазы, представляется целесообразным проведение дополнительных исследований с целью возможного расширения сферы применения

фермента, в качестве самостоятельного иммуномодулятора.

В последующей работе необходимо проведение экспериментальных исследований для готовой лекарственной формы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Смирнова И. П., Алексеев С. Б., Подборонов В. М. Изучение влияния гелевой формы L-лизин- α -оксидазы на развитие офтальмогерпеса и герпетических поражений кожи кролика. Антибиотики и химиотер 2003; 48: 11: 11—13.
2. Смирнова И. П., Диджяпетрени Я., Алексеев С. Б. и др. Воздействие L-лизин- α -оксидазы на карциному кожи мышей, индуцированную метилхолантеном. Там же 2001, 46: 4: 13—15.
3. Селищева А. А., Алексеев С. Б., Смирнова И. П., Подборонов В. М. Эффективность антигерпетического действия различных лекарственных форм L-лизин- α -оксидазы. Антибиотики и химиотер 2003; 48: 1: 9—12.
4. Жукова О. С., Хадуев С. Х., Берёзов Т. Т. Влияние L-лизин- α -оксидазы из *Trichoderma* sp. на кинетику цикла культивируемых клеток лимфомы Беркитта. Экспер онкол 1985; 6: 42—44.
5. Хадуев С. Х., Жукова О. С., Добрынин Я. В. и др. Цитостатический эффект L-лизин- α -оксидазы из *Trichoderma* sp. и из *Trichoderma viride*. Бюлл. экспер биол и мед 1987; 4: 458—460.
6. Хадуев С. Х., Глазкова Т. Ю., Веса В. С. и др. Оценка противовейкозной активности L-лизин- α -оксидазы из *Trichoderma* sp. в химиотерапевтических опытах. Там же 1980; 10: 476.
7. Уманский В. Ю., Хадуев С. Х., Залеток С. П. и др. Антиметастатический эффект L-лизин- α -оксидазы. Там же 1990; 5: 458—459.
8. Смирнова И. П., Алексеев С. Б., Подборонов В. М., Гришин В. М. Влияние L-лизин- α -оксидазы, как ингибитора репродукции ВИЧ на специфичность синтеза клеточных белков. Аллергол и иммунол 2005; 3: 3: 36—39.
9. Смирнова И. П., Гуськова Т. А., Пушкина Т. В., Подборонов В. М. Антибактериальная и антигрибковая активность L-лизин- α -оксидазы *Trichoderma*. Сибирь-Восток специал научно-производственный мед профиля журн 2003; 1: 61: 10—12.
10. Смирнова И. П., Шкинев В. М., Руднев А. В. и др. Технологии выделения и очистки L-лизин- α -оксидазы. Биотехнология 2010; 6: 52—60.
11. Подборонов В. М., Кузовников А. Е., Зайцева А. К., Смирнова И. П. Доклинические испытания противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы. Антибиотики и химиотер 2010; 9—10: 33—36.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 годы.