

Трофинотропин «Церебрал» — эндогенный нейроиммунопротектор, индуцирующий выработку γ -интерферона

А. Н. Макаренко, С. Л. Рыбалко

Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины
Ул. Эжена Потье, 14, Киев, 03057, Украина

Институт эпидемиологии и инфекционных болезней АМН Украины
Спуск Протасов Яр, 4, Киев, 03038, Украина

Представлены результаты изучения интерферониндуцирующего действия эндогенного регулятора ростовых факторов центральной нервной системы трофинотропина «Церебрала» на продуцирование интерферона лейкоцитами крови человека. Показано, что низкомолекулярные факторы препарата «Церебрала» индуцируют γ -интерферон в титрах 160—320 МЕ/мл, что, по-видимому, определяет механизм коррекции нарушений иммунной системы, развивающихся при остром геморрагическом инсульте.

Введение. Завершенный ишемический и особенно геморрагический типы острой недостаточности мозгового кровообращения (ОНМК) сопровождаются развитием резких нарушений в гуморальном и клеточном звеньях системного иммунного ответа [1]. Степень иммунных нарушений, во многом определяющая характер течения и исход геморрагического инсульта, может быть частично откорректирована при назначении ряда базисных антиинсульных средств [2].

В то же время установлено, что более выраженный эффект может быть достигнут в результате использования различных цитокинов, нейротрофинов и ростовых факторов (NGF), регуляторов их синтеза, характеризующихся иммуностимулирующим действием [3—6]. К их числу относится и трофинотропин «Церебрал» [7] — один из эндогенных регуляторов нейротрофических факторов. «Церебрал» представляет собой эффективное антиинсульное и нейропротекторное средство, в состав которого входит ряд низкомолекулярных регуляторных пептидных факторов (с молекулярной массой до 1200 Да)

интрацеребрального происхождения, а также нейропептиды, аминокислоты и молекулы других веществ [8]. По механизму фармакологического действия трофинотропина оказывают регуляторное влияние на синтез и секрецию нейротрофинов и ростовых факторов из семейства NGF при экспериментальном ОНМК.

В отличие от известного препарата церебролизина («Ebewe», Австрия), «Церебрал» выделяют из ряда отделов мозга подопытных животных, выздоравливающих после ранее воспроизведенного экспериментального геморрагического аутоинсульта, при этом использован предложенный нами способ получения трофинотропинов [9]. Кроме того, «Церебрал» оказывает антиинсульное действие при интраназальном пути введения препарата.

В ходе выполнения настоящей работы учитывали два принципиально важных положения. Во-первых, результаты экспериментальных и клинических исследований свидетельствуют о «синхронных» нарушениях системного иммунного ответа и реакции интерфероновой системы организма в стрессовых и экстремальных условиях при травматических, сосудистых и некоторых токсикоинфекционных заболеваниях организма [1]. Во-вторых, в

настоящее время изучена группа веществ (интерлейкины и интерфероны), которая включает цитокины преимущественно внесозгового происхождения. В то же время нейроактивирующее и иммунопротекторное влияние «Церебрала» у животных с геморрагическим ОНМК [6, 10] свидетельствует о важной роли низкомолекулярных пептидов трофинотропина в регуляции синтеза и секреции NGF и внесозговых цитокинов.

Представленное сообщение посвящено изучению интерферонотропной активности «Церебрала».

Материалы и методы. В опытах *in vitro* исследовали лиофильно высушенный препарат трофинотропин «Церебрал» разных серий (1—5), представляющий собой комбинацию 1,0 мг фармакологически активных веществ, приведенных выше, а также до 100 мг сахарозы. Специфическая активность препарата изучена в опытах *in vivo* на белых крысах-самцах с экспериментальным аутогеморрагическим инсультом с учетом концентраций данного средства. В других сериях опытов [6, 10] использовали его низкомолекулярные фракции, полученные гель-хроматографически с помощью сефадекса G-15 («Pharmacia», Швеция).

Работа выполнена с использованием вируса везикулярного стоматита (ВВС), штамм Индиана, полученного из музея вирусов Института вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН (Москва). Инфекционный титр в культуре клеток L41 составлял 4,0—5,0 Ig ТЦД₅₀.

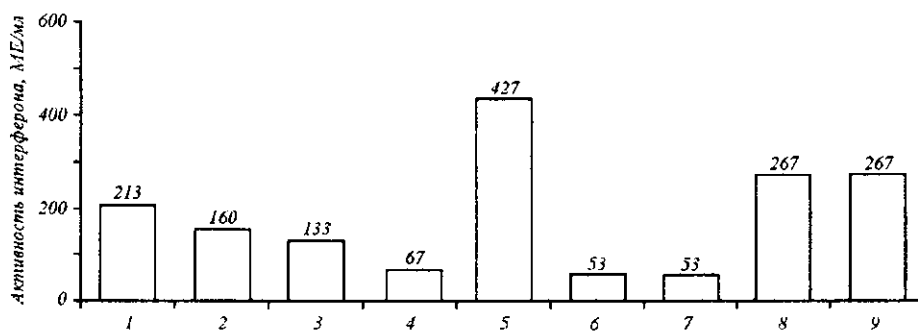
Интерферонотропную активность «Церебрала» исследовали в экспериментах *in vitro*. Для этого использовали лейкоциты крови доноров в концентрации $3 \cdot 10^6$ клеток/мл, к которым добавляли 0,1 мл 0,1 %-го раствора «Церебрала», инкубировали смесь при температуре 37 °С в течение 18 ч. Затем в надосадочной жидкости определяли активность интерферона по методу подавления цитопатогенного действия ВВС в гомологичной перевиваемой культуре клеток L41 [11].

Контролем служили клетки, обработанные ВВС (контроль вируса), а также интактные клетки, не подвергшиеся подобной обработке (контроль клеток). Опытные и контрольные культуры инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 ч и после полной дегенерации клеток в контроле вируса, а также при отсутствии дегенерации в контроле клеток проводили учет активности интерферона. Титром интерферона служила величина, обратная разведению препарата «Церебрала», при которой культура клеток на 50 % была защищена от цитопатогенного действия ВВС.

Тип интерферона определяли в реакции нейтрализации со специфическими моноклональными антителами к α - и γ -интерферонам, а также по маркерным показателям рН и прогревании при температуре 56 °С в течение 30 мин. В качестве препарата сравнения избран прототип «Церебрала» — церебролизин в той же дозе.

Результаты и обсуждение. Интерферониндуцирующую активность разных серий трофинотропина «Церебрала» изучали по описанной выше методике. Данные представлены на рисунке. Анализируя полученные результаты, следует отметить, что «Церебрал» всех серий обладал интерферониндуцирующей активностью, которая, в основном, была на уровне 160—320 МЕ/мл и соответствовала таковой препарата сравнения церебролизина.

На следующем этапе исследований изучали дозозависимый эффект «Церебрала», а также его характеристики. Полученные данные свидетельствуют о том, что интерферон, индуцированный трофинотропином «Церебралом», в разведениях 1:10, 1:100 и 1:1000 образует плато по активности, не зависящее от используемой дозы: без обработки активность составляла 160 МЕ/мл, после обработки при температуре 56 °С — 20 МЕ/мл, при рН 2,0 — 20 МЕ/мл. Исследуемый фактор был термолабильным и кислотолабильным, что соответствует характеристике γ -интерферона.



Интерферониндуцирующая активность «Церебрала». Условные обозначения: 1—5 — серии «Церебрала»; 6—8 — низкомолекулярные фракции трофинотропина; 9 — церебролизин

Для идентификации типа интерферона проведена реакция нейтрализации с моноклональными антителами к α - и γ -интерферонам. Показано, что моноклональные антитела к α -интерферону не нейтрализовали активности исследуемого фактора, в то время как моноклональные антитела к γ -интерферону полностью ингибировали активность интерферона, индуцированного «Церебралом».

Гамма-интерферон, или иммунный интерферон, не имея структурной гомологии с интерферонами α и γ , обладает противовирусной, иммуномодулирующей и антипролиферативной активностью и подобно другим цитокинам регулирует, в частности, экспрессию комплекса гистосовместимости I и II типов. Этот цитокин играет существенную роль в регуляции механизмов острого и хронического воспаления, обладая выраженным эффектом активации макрофагов. Одним из наиболее важных аспектов действия γ -интерферона является его способность стимулировать созревание и дифференциацию миелоидных клеток человека [12].

Известно, что некоторые клинические состояния и заболевания рассматриваются как дефицитные по γ -интерферону. К ним относятся состояния после трансплантации сердца [13], почек [14], костного мозга [15], при хронической лейкемии [16], селективном дефиците IgA [17], цитомегаловирусной инфекции [18], краснухе [19], множественном склерозе, миастении беременных, болезни Альцгеймера [20], СПИДе [21]. Гамма-интерферондефицитные состояния характеризуются уменьшением количества Т-хелперов, снижением ответа лимфоцитов на митоген *in vivo* и *in vitro*, дефицитом индукции антител после иммунизации, редукцией натуральных киллеров и антитело-зависимой клеточной цитотоксичности, дефектностью хемотаксиса моноцитов и митогенстимулированной продукции других типов интерферонов.

По-видимому, ишемический и геморрагический типы ОНМК также относятся к состояниям, дефицитным по γ -интерферону.

A. N. Makarenko, S. L. Rybalko

Trophinotropin «Cerebral» — endogenous neuroimmunoprotector and γ -interferon inducer

Summary

Interferon-inducing activity of «Cerebral», endogenous trophinotropin agent, controlling growth factors of CNS, has been evaluated in human blood leukocytes. «Cerebral» has been shown to induce γ -interferon at a titer of 160–320 IU/ml. Interferon-inducing activity of «Cerebral» may contribute to the correction mechanisms of immune disorders in patients with acute hemorrhagic stroke.

O. M. Makarenko, S. L. Rybalko

Трофинотропін «Церебрал» — ендогенний нейроімунотектор, який індукує продукцію γ -інтерферону

Резюме

Представлено результати вивчення інтерфероніндукуючої дії ендогенного регулятора ростових факторів центральної нервової системи трофінотропіну «Церебралу» на продукування інтерферону лейкоцитами крові людини. Показано, що низькомолекулярні фактори препарату «Церебралу» індукують γ -інтерферон у титрах 160–320 МЕ/мл, що, скоріш за все, визначає механізм корекції порушень імунної системи, які розвиваються при гострому геморагічному інсульті.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Barolin G. S., Koppi S., Kapeller E. Previous and novel approaches to stroke treatment. Metabolic active drugs using and rehabilitation outcome // Eur. Rehab.—1996.—N 3.—P. 135—143.
2. Машиковский М. Д. Лекарственные средства: пособие по фармакотерапии для врачей.—Харьков: Торсинг, 1997.—Т. 2.—С. 105.
3. Xiong H., Baskys A., Woitowicz J. M. Brain-derived peptides are inhibited transynaptic transmission by GABA-B receptors in CA1 region of rat hippocampal slices // Brain Res.—1996.—737, N 7.—P. 188—194
4. Benowitz L. Novel treatment in stroke. Endogenous low molecular weight factors support extensive CNS axon growth // Eur. J. Neuropsychopharm.—2000.—10, N 4, Suppl. 4.—S12.—P. 23.
5. Де'яткіна Т. О., Важнича О. М., Макаренко О. М. Вплив екстрактів неокортексу тварин на стан системи крові у постстрессорному періоді // Ліки.—1999.—№ 5—6.—С. 66—70.
6. Kuznetsova L. V., Kuznetsov O. G. The influence of medication «Cerebral» on T-lymphocytes of asthma patients // 4th Int. Congr. Sona'99 (Dakar, 12—16 April, 1999).—Dakar, 1999.—P. 30.
7. Makarenko A. N., Danilenko V. Ph., Koroliov Yu. N., Kasianov S. V. Vasoischemic brain pathology treatment by the SNC-TTR-Traumatrophical Neuropeptide Regulative Factor (Neurotrophinotropin) // 4th Congr. Sona'99 (Dakar, 12—16 April, 1999).—Dakar, 1999.—P. 127.
8. Maksymov Yu. N., Arkadyev V. G., Makarenko A. N., Pustovarov A. Yu. Immunological action of a new Trophinotropin factor «Cerebral» (SNC-TTP) for stroke and child cerebral pulsy treatment: Proc. 8th Meet. of World Fed. of Neurol. // Acta Neurol. Taiwan.—1999.—8, Suppl. 1.—P. 42.
9. Пат. України № 24299 А. Засіб для лікування інсульту та спосіб його отримання / О. М. Макаренко, Ю. Н. Корольов // Опубл. 28.02.2000 р.
10. Аркадьев В. Г., Новик Л. В., Пустоваров А. Ю., Максимов Ю. Н., Макаренко А. Н. Влияние «Церебрала» — нового антиинсультного средства на иммунную систему при экспериментальном геморрагическом инсульте // Эксперим. и клин. фармакология.—2001—64, № 4.—С. 20—24.
11. Ho M., Enders J. E. An inhibitor of viral activity appearing in infected cells culture // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1959.—45.—P. 385—389.
12. Takei M., Takeda K., Kuniok. The role of interferon- γ in induction of differentiation of human myeloid leukemia cell lines, ML-1 and HL-60 // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1984.—124.—P. 100—105.
13. Rand K., Rasmussen L. Cellular immunity and herpes virus

- infections in cardiac transplant patients // *N. Engl. J. Med.*—1977.—296.—P. 1372—1377.
14. *Weimer W., Jeekel H.* Deficient production of immune interferon in renal transplant recipients // *N. Engl. J. Med.*—1982.—307.—P. 1403—1407.
 15. *Levin M. J., Parkman R.* Proliferative and interferon responses by peripheral blood mononuclear cells after bone marrow transplantation in humans // *Infect. Immunol.*—1978.—20.—P. 678—684.
 16. *Epstein L. B., Cline M. J.* Chronic lymphocytic leukemia. Studies on mitogen stimulated lymphocyte interferon as a new technique for assessing T-lymphocyte effector function // *Clin. and Exp. Immunol.*—1974.—16.—P. 553—563.
 17. *Epstein L. B., Ammann A. J.* Evaluation of T-lymphocyte effector function in immunodeficiency diseases: abnormality in mitogen stimulated interferon in patients with selective IgA deficiency // *J. Immunol.*—1974.—112.—P. 617—626.
 18. *Starr S. E., Tolpin M. D., Friedman H. M.* Impaired cellular immunity to cytomegalovirus in congenitally infected children and their mothers // *J. Infect. Dis.*—1979.—140.—P. 500—505.
 19. *Buimovici-Klein E., Land P. B., Ziring P. R.* Impaired cell mediated immune response in patients with congenital rubella; correlation with gestational age at time of infection // *Pediatrics.*—1999.—64.—P. 620—626.
 20. *Vervliet G., Carlton H., Billau A.* Interferon- γ production by peripheral blood leukocytes from patients with multiple sclerosis and other neurologic diseases // *Clin. and Exp. Immunol.*—1985.—59.—P. 391—397.
 21. *Hart C. C., Murray H. W.* Cellular immunity and the acquired immunodeficiency syndrome // *Surv. Syn. Path. Res.*—1984.—3.—P. 397—408.

УДК 615.217 + 615.37 + 578.245:616.831-005.1
Надійшла до редакції 03.12.01