

Академик А. А. Галоян, Л. А. Камалян, М. Г. Гаспарян

Влияние нового цитокина мозга - галармина на синтез интерферона-гамма в мононуклеарах человека и на репликацию вируса энцефаломиокардита в клеточной культуре

(Представлено 6/ХІІ 2000)

Накопленные за последние десятилетия данные Отдела биохимии нейрогормонов Ин-та биохимии НАН РА им. Г. Х. Бунятына свидетельствуют о том, что мозг не только регулирует функции иммунной системы, но и является одним из ее органов [1, 2]. Основанием для такого утверждения послужили данные о биосинтезе ряда цитокинов не только клетками макро- и микроглии мозга, но и нейронами мозга. В частности А. Галоян и сотр. впервые выделили из нейросекреторных гранул, продуцируемых магнoцеллюлярными ядрами гипоталамуса животных, ряд интерлейкинов и идентифицировали: ИЛ-1а, ИЛ-1б, ИЛ-2, ИЛ-6, ФНОа [3]. Более того, удалось выделить из этих же гранул совершенно новую семью полипептидов и полностью расшифровать их первичную химическую структуру [1, 2]. Они обладают выраженными иммуномодулирующими свойствами. Один из этих полипептидов, содержащий 15 аминокислотных остатков, названный нами галармином (ГА), оказывает дозозависимое модулирующее действие на индуцированный ФГА пролиферативный ответ Т-лимфоцитов крови здоровых доноров. Причем препарат оказывает регулирующее влияние на Т-клеточный ответ в зависимости от фоновых пролиферативных свойств клеток разных доноров [4]. Галармин непосредственно воздействует на Т-лимфоциты, что показано в экспериментах с использованием Jurkat клеток (опухолевые Т-лимфоциты). Препарат дозозависимо подавляет пролиферацию этих клеток [4]. Галармин в условиях *in vitro* разрушает опухолевые клетки мышинных фибробластов (L-929) [5].

Галармин резко подавляет митотическую активность этих клеток, меняя также ультраструктуру - фрагментация ядра и цитоплазмы, разрушение внутренних мембран набухших митохондрий (зрелых L-929 клеток). Незрелые клетки L-929 под влиянием препарата подвергаются другому виду изменений в ультраструктуре, появляются пикнотические ядра, ядра с кариорексисом и кариолизисом, резко выраженный микроплазматоз [5]. Вместе с тем галармин оказывает влияние на активность каспаз лишь на дифференцированные бутиратом клетки нейробластомы N2A: в микромолярных концентрациях увеличивает активность каспаз-2 и каспаз-6, уменьшая активность каспаз-3 и каспаз-9 (основные протеолитические ферменты, ответственные за гибель клеток [6]). Многочисленные данные показали иммунокорректирующие, антибактериальные свойства галармина [7, 8], а также действие препарата на интерлейкин-2 зависимые функции лимфоцитов человека в культуре [9]. ГА подавляет ФГА индуцируемую митотическую активность мононуклеаров.

Вышеприведенные данные свидетельствовали о возможном действии вновь открытого А. Галояном и сотр. цитокина мозга - галармина на синтез интерферона-гамма (ИФН-гамма) в мононуклеарах человека *in vitro*, а также влияние его на репродукцию вируса энцефаломиокардита (ВЭМ) в клеточной культуре.

Индукция и титрование ИФН изучены у восьми здоровых лиц в возрасте от 20 до 40 лет, имеющих нормальный уровень лейкоцитов и лимфоцитов в крови.

Мононуклеары (МНК) периферической крови выделяли в градиенте фиколла-верографина и после трехкратного промывания в среде 199 культивировали в пенициллиновых флаконах (суспензионные культуры) из расчета $1 \cdot 10^6$ кл/мл в среде РПМИ-1640 с 10% бычьей сыворотки. Индукцию ИФН-гамма осуществляли с помощью митогена Т-клеток-ФГА в количестве 10 мкг/мл. Галармин вносили в количестве 40 мкг/мл. Спустя 72 ч с момента инкубации в термостате клетки осаждали и подсчитывали как в контроле (К), так и в опытных пробирках (с ФГА, ГА и с ФГА + ГА). Надосадочную жидкость из опытных флаконов титровали на наличие ИФН биологическим методом. С этой целью двукратные разведения проб в разведениях с 1:10 до 1:160 вносили в 96-луночные пластиковые планшеты с монослоем клеток линии НЕР-2 и спустя 18 ч добавляли ВЭМ - 50 тканевых цитопатогенных доз (ТЦД₅₀). Результаты опытов учитывали спустя 48 ч. За единицу ИФН принимали обратную величину максимального разведения проб, вызывающего защиту клеток монослоя от цитопатического действия вируса не менее чем в половине зараженных лунок. В качестве референс-препарата стандарта для выражения титра ИФН в международных единицах (МЕ) использовали рекомбинантный ИФН-α роферон с активностью $3 \cdot 10^6$ МЕ/мл (Фирма Хоффманн-Ля Рош, Швейцария).

Опыты по изучению действия цитокина на ВЭМ проводили двумя методами - определение вирулицидности ГА и влияние ГА на репликацию ВЭМ в клетках НЕР-2.

Для определения вирулицидности две концентрации ГА (20 и 40 мкг) соединяли с 50 ТЦД₅₀ ВЭМ (равные объемы в среде Игла с 10% сыворотки) и после инкубации в термостате в течение 2 ч вносили в лунки планшет с монослоем клеток НЕР-2. В контрольные лунки вносили только ВЭМ в дозе 50 ТЦД₅₀ после 2-часового выдерживания в термостате. О вирулицидности препарата судили по степени защиты клеток монослоя от цитопатического действия вируса, при наличии в контрольных лунках полной деструкции монослоя.

Влияние препарата на репликацию вируса в клетках НЕР-2 изучали в различных вариантах опытов: препарат вносили в клетки за 2 ч до заражения (I вариант), одновременно с заражением (II вариант) и спустя 2 ч после заражения (III

вариант). Контроль - только клетки+ВЭМ. За антивирусный эффект ГА принимали защиту монослоя не менее чем в половине зараженных лунок, при условии полной деструкции клеток в контроле вируса.

Прежде всего следует отметить, что в суспензионных культурах МНК галармин в дозе 40 мкг в течение 72 ч инкубации не оказывал отрицательного действия на жизнеспособность клеток, число которых в тысячах/мл составляло 765 ± 41 . Во флаконах только с ФГА уровень живых клеток равнялся 730 ± 35 . Однако во флаконах с ФГА и ГА число МНК было наибольшим - 940 ± 51 (разница по сравнению с ФГА статистически достоверна ($p < 0.02$)). В то же время в контроле (без ФГА) убыль клеток была значительной (422 ± 3.1). Результаты представлены на рисунке.

Полученные результаты свидетельствуют о митогенных потенциях ГА, так как уровень живых клеток в течение 72 ч был почти одинаков при воздействии как ФГА, так и ГА, а их совместное применение дало достоверный синергидный эффект.

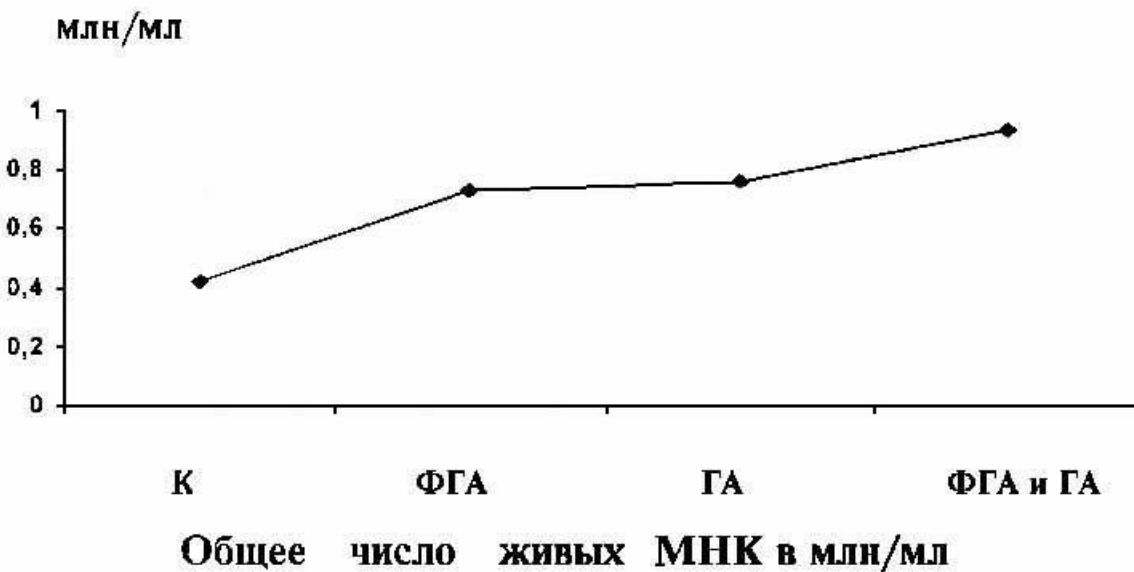
Усредненные результаты титрования проб на наличие ИФН-гамма представлены в табл. 1. Согласно данным таблицы, ГА не индуцировал синтеза ИФН (титр < 10 МЕ/мл) ни у одного из доноров. Только ФГА индуцировал синтез ИФН у всех доноров, усредненный титр составлял 45 ± 6.2 . Но в культурах МНК с ФГА и ГА уровень ИФН был достоверно выше уровня, обеспечиваемого ФГА ($p < 0.02$).

Таблица 1

**Стимулирующее действие нейроромона
на продукцию ИФН-гамма в мононуклеотидах**

Условия опытов	Титры ГФН в МЕ/мл	Достоверность р
Галармин	< 10	$p < 0.02$
ФГА	45 ± 6.2	
ФГА+ГА	86 ± 9.3	

Нейроромон не индуцирует синтеза ИФН в МНК, но достоверно повышает уровень ИФН при комбинированном применении ФГА и ГА. В свете приведенных выше данных литературы о стимулирующем эффекте ГА на функции Т-клеток и продукцию ИЛ-2 мы правомочны считать, что галармин стимулирует ТН1 клетки и тем самым способствует более активному синтезу не только ИЛ-2, но и ИФН под влиянием ФГА. Следовательно, ГА может служить праймингом при синтезе интерферона с помощью ФГА.



Влияние нейроромона на жизнеспособность мононуклеаров

В предварительных опытах было изучено возможное токсическое действие ГА на клетки Нер-2. Наблюдение за клеточной культурой в течение 5 дней показало, что даже при внесении галармина одновременно с посевом клеток в

дозах 10, 20 и 40 мкг/мл среды он при всех дозах не влияет на пролиферацию клеток и сроки формирования монослоя по сравнению с контролем (без галармина).

При изучении влияния ГА на ВЭМ были использованы дозы - 20 и 40 мкг. Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

**Вирулицидность ГА и влияние его
на репродукцию ВЭМ в клетках линии НЕР-2**

Условия опытов	Варианты опытов	Степень защиты клеток НЕР-2			
		при дозах галармина			
		20 мкг/мл		40 мкг/мл	
		Абс.	%	Абс.	%
Вирулицидность ГА	ГА+ВЭМ (опыт)	10/20	50	11/20	55
	ВЭМ (контроль)	0/20	0	1/20	5
Влияние ГА на репродукцию ВЭМ	ГА+ВЭМ через час	9/20	45	11/20	55
	ГА и ВЭМ одновременно	3/20	15	2/20	10
	ГА+ВЭМ через час	0/20	0	1/20	5

Примечание: числитель - число сохранивших монослой проб; знаменатель - общее число проб; доза вируса - 50 ТЦД₅₀/0.2 мл.

Согласно данным табл. 2, нейrogормон вирулициден, так как при контакте с ВЭМ вне клеток он нейтрализует цитопатическое действие вируса. Эффект ГА при обеих дозах почти одинаков. Обе дозы ГА ингибируют репродукцию ВЭМ в клетках лишь при предварительном внесении препарата в клетки.

Результаты других вариантов опыта отрицательны, так как обе дозы ГА защищают монослой от разрушения вирусом лишь в 15-10% испытуемых проб.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что галармин в концентрации 40 мкг/мл стимулирует пролиферацию лимфоцитов в коротко живущих культурах мононуклеаров периферической крови здоровых доноров.

Изученный препарат не индуцирует синтез ИФН-гамма *in vitro*, однако он достоверно увеличивает продукцию этого лимфокина при индукции ФГА. Прайминг эффект ГА можно объяснить пролиферацией лимфоцитов и активацией их лимфокинной функции. Поскольку ИФН-гамма и ИЛ-2 синтезируются, в основном, ТН1-хелперами, можно предполагать, что ГА преимущественно влияет на указанную субпопуляцию Т-хелперов.

Для изучения антивирусного действия ГА был использован вирус энцефаломиокардита мышей, широко распространенный среди людей и поражающий нейроны и миокард. Вирус размножается в нейронах головного мозга и с этих позиций является удобной моделью для изучения АВ-активности ГА.

Вирулицидный эффект препарата реализуется после контакта его с ВЭМ в течение 2 ч в условиях термостата. Механизм этого эффекта требует дальнейших исследований, однако можно думать о блокаде вирусспецифических рецепторов клетки галармином, вследствие чего ВЭМ лишается способности адсорбироваться, а следовательно, и проникать в клетки. К сожалению, о рецепторах пикорнавирусов, к которым относится и ВЭМ, известно мало, они являются белками, но не выделены, не очищены, а следовательно, пока не могут быть определены методом ИФА.

Согласно полученным данным, ГА угнетает репродукцию ВЭМ в клетках НЕР-2 лишь при условии внесения препарата за 1 ч до заражения. Препарат может действовать как на I фазу репродукции (адсорбция, проникновение и раздевание), так и на II фазу (трансляция и-РНК, репликация генома и сборка компонентов вируса).

Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности дальнейшего изучения с целью выявления механизмов воздействия галармина на синтез ИФН и репродукцию вирусов.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятяна НАН РА
Онкологический научный центр им. В. А. Фанарджяна

Литература

1. *Galoyan A. A.* Biochemistry of novel cardioactive hormones and immunomodulators of the functional system neurosecretory hypothalamus-endocrine heart. Moscow. Nauka publishers, 1997. P. 240.
2. *Galoyan A. A.* - Neurochem. Res. 2000. V. 25, N 9. P. 1343-1355.
3. *Galoyan A. A., Aprikian V. S., Markossian K. A., Gurvits B. Ya.* - Neurochemistry (RAS & NAS RA). 1998. V. 15. N 4. P. 361-372.
4. *Галоян А. А., Шахламов В. А., Богданова И. М., Малайцев В. В.* - Нейрохимия. 2001. Т. 17. N 4.
5. *Галоян А. А., Шахламов В. А., Богданова И. Л., Малайцев В. В.* - Медицинская наука Армении. 2001. Т. 41. N 1.
6. *Galoyan A. A., Terio N., Berg M. J., Marks N.* - Neurochemistry (RAS & NAS RA). 2000. V. 17. N 3. P. 185-188.
7. *Априкян В. С., Галоян А. А.* - Медицинская наука Армении. 1999. Т. 39. N 4. С. 29-35.
8. *Априкян В. С., Галоян А. А.* - ДНАН Армении. 1999. Т. 99. N 4. С. 367-371.
9. *Давтян Т. К., Мурадян Е. Б., Алексанян Ю. Т., Петросян А. А., Галоян А. А.* - Нейрохимия. 1998. Т. 15. N 1. С. 45-50.

Ակադեմիկոս Ա. Ա. Գալոյան, Լ. Ա. Քամալյան, Մ. Գ. Գասպարյան

Ուղեղի նոր ցիտոկինի՝ գալարմինի ազդեցությունը գամմա-ինտերֆերոնի սինթեզի վրա արյան մոնոնուկլեար բջիջներում և էնցեֆալոմիոկարդիտի վիրուսի ռեպլիկացիայի վրա HEp-2-կուլտուրայում

Ուսումնասիրված է առողջ մարդկանց պերիֆերիկ արյան մոնոնուկլեար բջիջներում գամմա-ինտերֆերոնի սինթեզը, ինչպես նաև էնցեֆալոմիոկարդիտի վիրուսի ռեպլիկացիան HEp-2-բջիջներում Ա. Գալոյանի կողմից հայտնաբերված ուղեղի նոր ցիտոկինի՝ գալարմինի ազդեցության ներքո in vitro: Ուսումնասիրությունները պարզել են, որ գալարմինը նպաստում է ինտերֆերոնի սինթեզին, երբ այն զուգակցվում է միտոգեն ֆիտոհեմագլյուտինինի հետ: Ապացուցված է, որ գալարմինն ունի վիրուլիցիտ հատկություն և ինհիբիցիայի է ենթարկում էնցեֆալոմիոկարդիտի հարուցիչ վիրուսի ռեպլիկացիան նշված բջիջների HEp-2-կուլտուրայում: Գալարմինը ճնշում է նշված վիրուսի վերարտադրումը HEp-2-բջիջներում այն դեպքում, երբ գալարմինը տրվում է վարակումից 1 ժամ առաջ, ընդ որում պատրաստուկը կարող է ազդել ինչպես ռեպրոդուկցիայի I-ֆազայի (ադսորբցիա թափանցում), այնպես էլ II-ֆազայի (ինֆորմացիոն ԴՆԹ-տրանսլյացիա, գենոմի ռեպլիկացիա և վիրուսի կոմպոնենտների հավաք) վրա: