

ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

ФЕНОТРОПИЛ КАК МОДУЛЯТОР УРОВНЯ ЦИТОКИНОВ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИММУНОПАТОЛОГИИ

И. Н. Тюренков¹, М. А. Самотруева², А. А. Цибизова², А. Л. Ясенявская²

Изучено влияние фенотропила на уровень цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-4 и ИЛ-6 в условиях циклофосфамидной иммунодепрессии (циклофосфамид — 150 мг/кг внутривнутрибрюшинно, однократно) и липополисахаридной гиперреактивности иммунной системы (липополисахарид *Pseudomonas aeruginosa* — 100 мкг/кг внутривнутрибрюшинно, однократно). Исследование выполнено на 48 крысах-самцах линии Вистар 6–8 месячного возраста в 2 серии. Каждая серия выполнялась по сходному дизайну на 3 группах животных: 1 группа — интактные животные, 2 группа получала циклофосфамид (1 серия) или липополисахарид (2 серия). Животные группы 3 получали фенотропил на фоне модуляторов иммунитета. Фенотропил (синтезированный сотрудниками кафедры органической химии РГПУ им. А. И. Герцена под руководством зав. кафедрой, д.х.н., проф. В. М. Берестовицкой, Санкт-Петербург) вводили в дозе 25 мг/кг внутривнутрибрюшинно в течение 5 дней, начиная за 2 дня до введения индукторов изменения активности иммунной системы. Уровень сывороточных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-4 и ИЛ-6 определяли методом ИФА. При иммунодефиците, вызванном циклофосфамидом, наблюдалось значительное снижение ИЛ-1 β , ИЛ-4 и ИЛ-6. Фенотропил в значительной степени восстанавливал их уровень. При стимуляции иммунного ответа липополисахаридом наблюдалось повышение уровня провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β и ИЛ-6 и снижение уровня противовоспалительного ИЛ-4. В этих условиях фенотропил практически до нормы снижал уровень ИЛ-1 β и ИЛ-6 и повышал уровень ИЛ-4.

Ключевые слова: фенотропил; цитокины; интерлейкин-1 β ; интерлейкин-4; интерлейкин-6; циклофосфамид; липополисахарид; нейроиммунотропная модуляция.

ВВЕДЕНИЕ

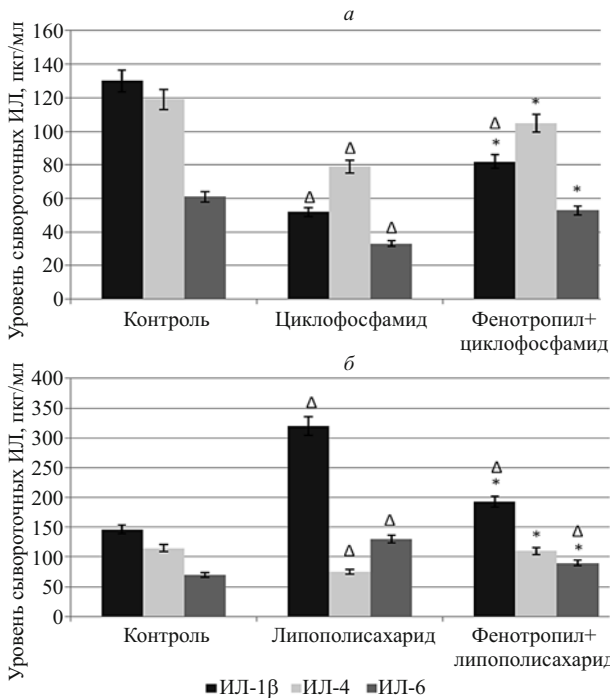
В современной литературе сформировалось четкое представление о том, что цитокины, являясь основными иммуномедиаторами, помимо выполнения своих специфических функций, осуществляют и межсистемные связи, в первую очередь, регулируя взаимодействие между иммунной и нейроэндокринной системами [9, 11, 12, 14]. С позиции регуляции нейроиммунных взаимодействий при физиологических и патофизиологических процессах важными являются следующие цитокины: фактор некроза опухолей (ФНО), фактор роста нервов (ФРН) и ряд интерлейкинов (ИЛ), в большей степени ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6 и др. [12, 13].

Теория “цитокины как координаторы нейроиммунных взаимодействий” позволяет не только объяснить особенности патогенеза ряда заболеваний центральной и иммунной систем, но и подчеркнуть важную роль фармакологической модуляции уровня цитокинов, что является предпосылкой к разработке новой стратегии лечения различных нейро- и иммунопатологических процессов [1, 15].

¹ ГБОУ ВПО “Волгоградский государственный медицинский университет” Минздрава России, Россия, 400131, Волгоград, пл. Павших борцов, д. 1.

² ГБОУ ВПО “Астраханский государственный медицинский университет” Минздрава России, Россия, 414000, Астрахань, ул. Бакинская, д. 121.

В медицинской практике как психотропное средство широкого спектра действия активно применяется фенотропил, структурную основу которого составляет замкнутая в цикл γ -аминомасляная кислота (ГАМК), являющаяся важнейшим тормозным медиатором и регулятором действия других медиаторов. Механизмы реализации эффектов фенотропила определяются прежде всего его нейрометаболическим профилем. Являясь производным пирролидона, фенотропил проявляет следующие эффекты: повышение уровней нейромедиаторов (дофамина, ГАМК и др.), повышение уровня АТФ, активация аденилатциклазы, уменьшение активности Na^+ , K^+ -АТФазы, усиление активности синосомальной фосфолипазы А, угнетение выброса пролина, усиление синтеза ядерной РНК в мозге, усиление утилизации глюкозы [2, 3, 5]. Принимая во внимание регулирующее влияние фенотропила на уровень нейромедиаторов, играющих важную роль в координации нейроиммунных взаимодействий [8], считаются актуальными исследования, посвященные изучению иммуотропного действия препарата и механизмов его реализации. В ранее проведенных нами работах на моделях циклофосфамидного иммунодефицита и липополисахаридного иммунного стресса была доказана способность фенотропила при однократном и курсовом применении уменьшать экспериментально-индуцированные иммунные нарушения, проявляющиеся в виде изменений интенсивности реакций гиперчувствительности замедленного типа и прямой гемагглютинации, а также фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови [6, 7, 9].



Влияние фенотропила на уровень ИЛ в плазме крови у крыс в условиях циклофосфамидной иммунодепрессии и липополисахаридного иммунного стресса: Δ — $p < 0,05$ — по сравнению с контролем; * $p < 0,05$ — по сравнению с группами животных, получающих циклофосфамид или липополисахарид.

Учитывая ключевую роль цитокинов в регуляции иммунитета, нейроиммунных и нейроэндокринных взаимодействий, нам представлялось важным изучить влияние фенотропила на уровень ИЛ-1 β , ИЛ-4 и ИЛ-6 в крови животных в условиях иммунодепрессии и стимуляции иммунной системы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на 48 крысах-самцах линии Вистар 6–8 мес возраста, массой 210–280 г. Работу с животными проводили в соответствии с Приказом МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. “Об утверждении правил лабораторной практики” (GLP). Эксперимент проводили в 2 серии: в 1-й изучали уровень ИЛ в плазме крови крыс на модели иммунодепрессии (циклофосфамид (“Биохимик”, Россия), 150 мг/кг, внутривенно, однократно); во 2-й — на модели иммунного стресса (липолисахарид *Pseudomonas aeruginosa*, НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи/Медгамал, Россия, 100 мкг/кг, внутривенно, однократно).

Животные каждой серии были распределены на 3 группы ($n = 8$): 1-я группа — интактные животные, 2-я группа — животные с индуцированными циклофосфамидом (1 серия) или липополисахаридом (2 серия) изменениями активности иммунной системы и 3-я группа — крысы с иммунными нарушениями, получавшие интраперитонеально фенотропил (синтезированный сотрудниками кафедры органической химии РГПУ им. А. И. Герцена под руководством зав. кафедрой, д.х.н., проф. В. М. Берестовицкой, Санкт-Петербург) в дозе 25 мг/кг в течение 5 дней. Введение фенотропила начинали за 2 дня до моделирования иммунопатологии [9]. Через 1 сут по-

сле последнего введения фенотропила производили выведение животных из эксперимента методом декапитации и осуществляли забор крови для исследования.

Уровень сывороточных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-4 и ИЛ-6 тестировали твердофазным иммуоферментным методом “сэндвича”. Процедура выполнения ИФА проводилась с использованием наборов фирмы “Bender Medsystems” (Австрия). Оптическую плотность регистрировали на анализаторе иммуоферментных реакций (АИРФ-01 “Униплан”, ЗАО “Пикон”, Москва) при длине волны 450 нм.

Статистическую обработку результатов проводили при помощи пакетов программ Microsoft Office Excel 2007, BIostat 2008 Professional 5.8.4.3. с определением критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони. Принимали во внимание эффекты при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы установлено, что в сыворотке крови животных, подверженных воздействию циклофосфамида, наблюдалось достоверное снижение концентрации всех изучаемых в работе ИЛ. Следует подчеркнуть, что наиболее чувствительным к действию циклофосфамида является ИЛ-1 β , уровень которого в сыворотке по сравнению с группой интактных животных снизился более чем в 2 раза ($p < 0,05$) (рисунок, а). При анализе динамики цитокинов в сыворотке крови животных с иммунодепрессией под влиянием фенотропила отмечено достоверное увеличение уровня и провоспалительных (ИЛ-1 β и ИЛ-6) и противовоспалительного (ИЛ-4) иммуномедиаторов ($p < 0,05$) (рисунок, а).

Результаты изучения изменений цитокинового профиля при иммунном стрессе, индуцированном введением липополисахарида, показали нарастание уровня провоспалительных ИЛ-1 β и ИЛ-6 практически в 2 раза ($p < 0,05$) (рисунок, б). Что касается динамики противовоспалительного ИЛ-4, отмечено достоверно значимое снижение концентрации данного цитокина в 1,7 раз ($p < 0,05$). Полученные результаты вполне закономерны и объясняются формированием на фоне введения ЛПС микробной стенки *Pseudomonas aeruginosa* острой воспалительной реакции.

Оценка влияния фенотропила на уровень провоспалительных ИЛ-1 β и ИЛ-6 на фоне действия липополисахарида показала, что изучаемый препарат вызывает подавление продукции данных цитокинов, сопровождающееся снижением показателей практически на 50 % ($p < 0,05$). В отношении же ИЛ-4 фенотропил проявил корректирующее действие и восстановил уровень цитокина практически до показателей “нормы” в контрольной группе ($p < 0,05$) (рисунок, б).

ИЛ-1 β запускает синтез других иммуномедиаторов, координируя развитие клеточных и гуморальных иммунологических реакций, стимулирует пролиферацию антигенчувствительных Т-лимфоцитов. В этой связи можно предположить, что модулирующее влияние фенотропила на интенсивность клеточно-опосредованной реакции гиперчувствительности замедленного типа [6, 7, 9], определяется его способностью восстанавливать уровень данного цитокина.

ИЛ-4 относится к противовоспалительным иммунорегуляторным цитокинам и является В-клеточным стимулиру-

рующим фактором, индуцируя переключение синтеза IgG₁ на синтез IgG₄ и IgE [4]. В данной работе мы доказали корригирующее влияние фенотропила на уровень ИЛ-4 в регуляции гуморальной иммунной реакции прямой гемагглютинации, установленной нашими исследованиями [6, 7, 9].

ИЛ-1 β , ИЛ-4 и ИЛ-6 обладают широким спектром активности, являясь как эндогенными дифференцировочными или активационными факторами иммунной системы, так и регуляторами взаимодействия между иммунной и центральной нервной системами. Увеличение продукции провоспалительных цитокинов наряду с подавлением противовоспалительных приводит к возникновению различных патологических состояний организма, высокий процент среди которых занимают церебральные нарушения [4, 16]. Можно предположить, что доказанная в данной работе способность фенотропила восстанавливать баланс про- и противовоспалительных цитокинов в условиях изменения активности иммунной системы лежит в основе не только иммуно-, но и нейротропного действия препарата.

Доказанный факт модуляции фенотропилом уровня интерлейкинов (ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6) в зависимости от его исходного состояния [7] и иммунного ответа указывает на возможный механизм реализации его нейроиммунотропного действия, что актуализирует дальнейшее изучение данной активности препарата в клинических условиях.

ВЫВОДЫ

1. Фенотропил при интраперитонеальном введении животным с циклофосфамид-индуцированной иммунодепрессией в дозе 25 мг/кг в течение 5 дней способен повышать уровень сывороточных ИЛ-1 β , ИЛ-4 и ИЛ-6, статистически значимо увеличивая параметры практически в 1,5 раза по сравнению с таковыми у крыс с иммунными нарушениями.

2. Интраперитонеальное введение фенотропила в дозе 25 мг/кг в течение 5 дней животным с липополисахарид-

индуцированным иммунным стрессом сопровождается подавлением гиперпродукции провоспалительных ИЛ-1 β и ИЛ-4, что приводит к снижению уровней указанных цитокинов более чем в 1,5 раза. Следует отметить восстановление под влиянием фенотропила уровня противовоспалительного ИЛ-4 практически до показателей "нормы" в контрольной группе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. А. Александровский, В. П. Чехонин, *Клиническая иммунология пограничных психических расстройств*, ГЭОТАР-Медиа, Москва (2005).
2. В. И. Ахапкина, Т. А. Воронина, *Фарматека*, № 3, 19 – 25 (2005).
3. Ю. Б. Белоусов, М. А. Мухина, *Качеств. клин. практика*, № 3, 1 – 12 (2005).
4. Ю. А. Витковский, *Иммунология*, № 1, 43 – 46 (2001).
5. Г. И. Ковалев, *Нервные болезни*, № 4, 22 – 26 (2007).
6. М. А. Самотруева, И. Н. Тюренков, Д. Л. Теплый и др., *Мед. иммунол.*, № 6, 567 – 570 (2009).
7. М. А. Самотруева, И. Н. Тюренков, Д. Л. Теплый и др., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, № 1, 59 – 62 (2011).
8. М. А. Самотруева, Д. Л. Теплый, И. Н. Тюренков, *Естеств. науки*, № 4, 112 – 130 (2009).
9. И. Н. Тюренков, Х. М. Галимзянов, Д. Л. Теплый и др., *Иммунология*, № 5, 302 – 305 (2009).
10. И. С. Фрейдлин, *Мед. иммунол.*, 7(4), 347 – 354 (2005).
11. В. А. Черешнев, Б. Г. Юшков, В. Г. Климин, *Вест. Урал. мед. академ. науки*, № 1, 47 – 54 (2003).
12. С. М. Conti, M. Fulcheri, *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, 24(4), 485 – 490 (2010).
13. E. Giraldo, J. J. Garcia, M. D. Hinchado, et al., *Neuroimmunomodulation*, 16(4), 237 – 244 (2009).
14. M. R. Irwin, *Brain Behav. Immun.*, 22(2), 129 – 139 (2008).
15. S. J. Lalor, B. M. Segal, *J. Neuroimmunol.*, 27(1), 56 – 61 (2010).
16. A. J. Thomas, S. Davis, Ch. Morris, et al., *J. Psychiatr.*, 162(1), 175 – 177 (2005).

Поступила 08.07.15

PHENOTROPIL AS MODULATOR OF CYTOKINE LEVEL UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL IMMUNOPATHOLOGY

I. N. Tyurenkov¹, M. A. Samotruева², A. A. Tsibizova², and A. L. Yasenyavskaya²

¹ Chair of Pharmacology and Biopharmacy, Faculty of Postgraduate Medical Training, Volgograd State Medical University, pl. Pavshikh Bortsov 1a, Volgograd, 400131 Russia;

² Department of Pharmacognosy, Pharmaceutical Technology and Biotechnology, Astrakhan State Medical University, ul. Bakinskaya 121, Astrakhan, 414000 Russia

We have studied the effect of phenotropil on the level of cytokines IL-1 β , IL-4, and IL-6 under conditions of immunosuppression induced by cyclophosphamide (150 mg/kg, single i.p. injection) and under immune system hyperreactivity caused by lipopolysaccharide (LPS of *Pseudomonas aeruginosa*, 100 μ g/kg, single i.p. injection). The experiments were performed on 48 Wistar male rats aged 6 – 8 months. Each series was carried out according to similar schedule on three groups of animals: group 1, intact animals; group 2 received cyclophosphamide (series 1) or LPS (series 2); group 3 received phenotropil on the background of immunomodulators. Phenotropil (synthesized at the Department of Organic Chemistry of the A. I. Herzen St. Petersburg Pedagogical University) was administered in a dose of 25 mg/kg (i.p.) for 5 days, starting 2 days before the introduction of immune system activity modulators. The levels of serum cytokines IL-1 β , IL-4, and IL-6 were determined by ELISA "sandwich" with the use of monoclonal antibodies (ELISA kits of BenderMedsystems company; instrument Uniplan AIRF-01 of Picon company, Moscow) at a wavelength of 450 nm. In case of immunodeficiency caused by cyclophosphamide, there was a significant decrease in IL-1 β , IL-4 and IL-6, but the introduction of phenotropil largely restored their levels. Upon stimulation with LPS, the immune response showed increase in pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and decrease in IL-4. Under these conditions, phenotropil restored the normal levels of IL-1 β , IL-6 and caused an increase in the level of IL-4.

Keywords: phenotropil; cytokines; interleukin-1 β ; interleukin-4; interleukin-6; cyclophosphamide, lipopolysaccharides; neuroimmunomodulation.