Sonderdruck aus:

erfahrungs-heilkunde

ZEITSCHRIFT FÜR DIE ÄRZTLICHE PRAXIS

Band 30 · Heft 11, November 1981 · KARL F. HAUG VERLAG GMBH & CO. · 6900 HEIDELBERG

(Aus der Abteilung für Therapeutische Biochemie, Zentrum der Biologischen Chemie der Universität Frankfurt/Main)

Über die Interferon induzierende Wirkung von RN 13 Regeneresen®

Von *A. Wacker* und *Astrid Eichler*

Einleitung

Im Jahre 1957 wurde mit dem Interferon ein Naturstoff entdeckt, der das Wachstum von DNS- als auch RNS-Viren hemmt. Seine Synthese im Organismus wird durch Viren selbst induziert. Bemerkenswert ist, daß Interferon nicht virusspezifisch, sondern spezies-spezifisch ist, d.h. bei Viruserkrankungen beim Menschen nur menschliches Interferon wirksam ist [1]. Wegen seines äußerst geringen Vorkommens dauerte es Jahre, bis es 1980 gelang, seine chemische Natur aufzuklären [2]. Dabei fand man, daß es mehrere Interferone gibt. – Im Laufe der vergangenen Jahre zeigte sich, daß Interferon nicht nur ein Virushemmstoff ist, sondern auch regulierend in das Immunsystem eingreift [1].

Wir haben uns bisher mit der Induktion von Interferon beschäftigt. Leider ist der beste Interferoninduktor, die doppelsträngige Ribonukleinsäure Poly IC (die in der Natur nicht vorkommt) toxisch und somit für eine Anwendung beim Menschen nicht geeignet [1]. Unser Hauptstreben war daher die Suche nach nicht toxischen Interferoninduktoren. Wir berichten nachfolgend über einen Induktor auf tierischer Basis, der schon lange in der Medizin verwendet wird und aus tierischer Ribonukleinsäure besteht.

RN 13 Regeneresen®, das der Hersteller für geriatrische Beschwerden empfiehlt [3], enthält RNS aus 13 tierischen Organen und zusätzlich RNS aus Hefe. In der Präparation läßt sich noch eine kleine Menge DNS und Eiweiß nachweisen [4]. Wir haben uns im Rahmen unserer Untersuchungen über die Interferon induzierende Wirkung von Arzneimitteln auch mit den verschiedenen Regeneresen beschäftigt und möchten nachfolgend über die Wirkung von RN 13 Regeneresen® berichten. Wir sind dabei so vorgegangen, daß wir verschiedene Mengen RN 13 der weißen Maus i.p. verabreicht haben. Nach bestimmten Zeiten haben wir der Maus das Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus entnommen und dieses nach der Methode *von Finter* [5] auf Interferon getestet. Zum Vergleich diente Interferon, das durch Poly IC unter den gleichen Bedingungen induziert war.

Material und Methoden

Substanzen

RN 13 Regeneresen nach Prof. *Dyckerhoff*® [3]: 1 Ampulle (5 ml) enthält 6 mg organspezifische Ribonukleinsäuren aus Gefäßwand, Großhirnrinde, Herz, Hypophyse, Hypothalamus, Leber, Milz, Nebennierenrinde, Niere, Ovar, Plazenta, Thalamus, Testis und unspezifische Ribonukleinsäure aus Hefe.

Poly IC: Synthetische doppelsträngige Ribonukleinsäure, Polyinosin-Polycytidylsäure.

Mäuse: SPF NMRI wl., Gewicht: 25–30 g, Fa. Dr. Ivanovas GmbH, Kisslegg/Allgäu.

Zellen

Maus-L-Fibroblasten, Klon 929 (L-929-Zellen), wurden in stationärer Kultur in 1200 ml Roux-Kolben gezüchtet. Als Nährmedium diente Minimum Essential Medium (MEM). Das Anzuchtmedium enthielt 10% Kälberserum. An Antibiotika wurden je Liter Medium zugesetzt: Dihydrostreptomycin 0,1 g, Penicillin 100000 IE, Amphotericin B 2 mg. Alle sieben Tage wurden die Zellen mit 0,25%iger Trypsinlösung behandelt und neu ausgesät.

Viren

Das Vesicular-stomatitis-Virus (VSV), Serotyp Indiana, wurde auf Maus-L-Fibroblasten vermehrt. 2 ml

der mit Minimum Essential Medium auf eine Konzentration von 10^{-6} verdünnten Virussuspension waren zur Adsorption 1 Stunde lang in einem Kolle-Kulturkolben mit den Zellen in Kontakt. Nach dem Dekantieren des Virus wurden 20 ml MEM + 10% Kälberserum hinzugefügt und bis zur völligen Zerstörung der Zellen bei 36° C bebrütet. Danach wurden die Zellen in Trokkeneis rasch eingefroren und nach 1 Stunde wieder aufgetaut. Dadurch wurde eine vollständige Freisetzung des Virus bewirkt. Nach dem Auftauen wurde die Suspension 10 Min. lang bei ca. 120 g zentrifugiert, um Zelltrümmer zu beseitigen. Der Überstand wurde in Portionen von je 1 ml eingefroren und bei –25° C aufbewahrt.

Lösungen und Medien

Physiologische Salzlösungen: Phosphatgepufferte Salzlösung nach *Dulbecco* (PBS). Minimum Essential Medium Eagle. Kälberserum: Von bis zu sieben Tage alten Kälbern [6].

Farbtest nach Finter [5]

Von Maus-L-929-Zellen wird eine Zellsuspension von 3 x 10^5 Zellen/ml hergestellt. Je 1 ml dieser Suspension wird in Glas-Rollrandröhrchen ausgesät. Die Zellen wachsen innerhalb von 48 Stunden zu einem geschlossenen Monolayer aus. – Das Interferon-haltige Serum wurde in verschiedenen Konzentrationen für 1 Stunde auf die Zellen gegeben. Danach wurde der Überstand durch frisches Medium ersetzt, nach 24 Stunden erneut dekantiert und mit 0,2 ml VSV-Suspension 10^{-6} 1 Stunde bei 37° C bebrütet. Nach dem Abgießen des Virus wurden die Zellen erneut mit MEM + 10% Kälberserum überschichtet und 24 Stunden bei 37° C bebrütet. Die Viruskonzentration war so bemessen, daß nach 24 Stunden Bebrüten lichtmikroskopische, morphologische Veränderungen in der Zelle nachgewiesen werden konnten. Die quantitative Auswertung erfolgte durch Anfärben der Zellkultur mit Neutralrot. Es wird eine 1%ige Stammlösung mit PBS im Verhältnis 1:75 verdünnt. 0,4 ml hiervon werden in das Medium jedes Kulturröhrchens pipettiert und 2 Stunden lang bei 37° C bebrütet. Während dieser Zeit nehmen die lebenden Zellen der Kultur den Farbstoff auf. Nach Ablauf der 2 Stunden wird das überstehende Medium abgegossen, und die Zellen werden zweimal mit erwärmter PBS gewaschen, anschließend wird die von den stoffwechselaktiven Zellen aufgenommene Farblösung mit einer gepufferten Äthanollösung (Äthanol 95%ig, vergällt: 0,1 M NaH_2PO_4-Lösung = 1:1 Vol.) extrahiert. Die Extinktion der so gewonnenen Farblösungen wird dann photometrisch bestimmt. Zum Vergleich werden Zellkulturen, die weder Substanz noch Virus enthalten (Zellkontrolle) und Kulturen, die nur mit Virus inkubiert waren (Viruskontrolle), gemessen. Pro Substanzkonzentration werden 3 Rollrandröhrchen angelegt, deren gemeinsame Extinktion bestimmt wird. – Messung der Extinktionskurve am Zeiss Spectralphotometer PMQ II bei 540 nm.

Ergebnisse

Wenn man der NMRI-Maus 50 µg Poly IC i.p. verabreicht und nach 18 Stunden das Interferon-haltige Blut isoliert und dessen Gehalt an Interferon bestimmt, so findet man (in mehreren Versuchen, die an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden) eine Hemmung von VSV-Virus von 80% (100% Hemmung wäre ein Wert, der vollständig die Virusvermehrung hemmt). 0,25 ml der Original-Ampulle RN 13 Regeneresen® (Chargen-Nr. 251) bewirkt eine 40–45%ige Hemmung der Virusvermehrung.

Der Zeitpunkt der Blutentnahme bei der Maus ist für den Interferongehalt von großer Bedeutung. Entnimmt man das Blut bereits nach 10 Stunden, so erreicht man mit der erhaltenen Menge Interferon eine 20%ige Hemmung der Virusvermehrung, nach 12 Stunden 30%, nach 18 Stunden 40–45% und nach 24 Stunden ist der Interferonspiegel wieder so weit abgesunken, daß man damit nur eine Hemmung von 15% erreicht.

Die Menge des verabreichten RN 13 Regeneresen® pro einer Maus (Original-Ampulle 5 ml) ist für die Hemmwirkung wichtig. Bei 0,1 ml erhielten wir 30–40% Hemmung, bei 0,25 ml RN 13 Regeneresen® 40–45%, bei 0,5 ml 20–30% und bei 1 ml RN 13 30–35%.

Es war für uns nun von besonderem Interesse, RN 13 wiederholt zu verabreichen, um zu sehen, ob

wir eine Steigerung der induzierbaren Menge Interferon erhalten. Wir erhielten bei einmaliger Verabreichung von 0,25 ml RN 13 Regeneresen® 40–45% der maximal induzierbaren Interferonaktivität. Wurden in dreimaligem Abstand von je 24 Stunden 0,25 ml Regeneresen verabreicht, so war die erhaltene Hemmwirkung nach der letzten Gabe 25–30% und bei einer fünfmaligen Impfung im Abstand von je 24 Stunden 25–30%. Wurden in einem Abstand von je 2 Tagen dreimal 0,25 ml RN 13 verabreicht, so war die Hemmwirkung 20–30% (im Vergleich zu 40–45% bei einer einmaligen Verabreichung). Wurden 3mal im Abstand von 4 Tagen 0,25 ml RN 13 verabreicht, so war die Hemmwirkung 25%. Wurde der Abstand zwischen den Impfungen auf 6 Tage ausgedehnt und 3mal 0,25 ml RN 13 geimpft, so war die Interferonaktivität 20% im Vergleich zu 40–45% bei einmaliger Impfung.

Läßt man das Interferon-haltige Blut 24 Stunden bei pH 2 stehen, so bleibt weniger als die Hälfte der Interferonaktivität nach RN 13-Induktion erhalten. Der Interferongehalt des Blutes einer unbehandelten Probe ist für 24 Stunden stabil. – Eine 2stündige Behandlung der Interferon-haltigen Blutprobe mit dem Enzym Pronase läßt die Aktivität beträchtlich absinken; das gleiche gilt auch für den Interferonversuch, in dem durch Poly IC das Interferon induziert wurde.

Diskussion

Gegenwärtig kennt man 3 Arten von Interferon [7], die von dem produzierenden Zelltyp und dem Induktor geprägt werden. Es sind dies Leukozyteninterferon (HuIFN-α), Lymphoblasteninterferon (HuIFN-α), Fibroblasteninterferon (HuIFN-β) und Immuninterferon (HuIFN-γ). Während Interferon-α von Sendaivirus induziert werden kann, ist es bei Interferon-β die doppelsträngige RNS Poly IC. . Das Interferon-γ, das von den T-Lymphozyten des Blutes gebildet wird, benötigt als Induktor ein spezifisches Antigen oder T-Zellmitogen.

Nach unserer Erfahrung ist der Typ des Induktors nicht streng spezifisch für das Interferon, das gebildet wird. Wir sind der Meinung, daß z. B. Poly IC alle Interferone induzieren kann, wenn auch die gebildete Menge je nach Zelltyp unterschiedlich ist. Wir folgern aus verschiedenen Befunden, wie z. B. Säurestabilität und anderen Kriterien, daß in unseren Versuchen das von uns aus dem Blut der weißen Maus nach RN 13-Gabe isolierte Interferon mehr dem Typ des Immuninterferons gleicht. Leider steht uns derzeit noch kein Standardpräparat von Immuninterferon zur Verfügung, so daß wir unser Interferon nicht chromatographisch vergleichen können. Unsere Versuche hatten ja als Ziel, einen nicht toxischen Interferoninduktor zu finden, und wir glauben, mit dem RN 13 einen solchen gefunden zu haben. Der größe Vorteil dürfte dabei der sein, daß RN 13 schon lange Jahre beim Menschen mit dem besten Erfolg für andere Zwecke angewandt wird [8]. – Damit kämen wir zur Wirkungsweise. *Dyckerhoff* [9] ist ursprünglich davon ausgegangen, daß die Nukleinsäuren die Voraussetzung für die Eiweißsynthese sind. Dies gilt, wie unzählige Arbeiten der letzten Jahre bewiesen haben, tatsächlich. Wir haben mit den relativ kleinen RNS-Molekülen im Regeneresen keinen überzeugenden Hinweis bei unseren in *vitro*-Untersuchungen für eine Eiweißsynthese gefunden. Andererseits hat das Interferon neben seiner herausragenden Bedeutung als Virushemmstoff einen großen Einfluß auf die Regulierung des Immunsystems, wie z. B. Aktivierung der Natural Killer Cells [10].

Wie unsere Versuche gezeigt haben, ist die Menge des gebildeten Interferons zeitabhängig, wie man das auch von anderen Interferoninduktoren in verschiedenen Zellsystemen weiß [1]. Die überraschende Tatsache, daß die gebildete Menge Interferon sich nicht beliebig steigern läßt, geht aus 2 Versuchsreihen hervor. Zum ersten ist die Menge des verabreichten Induktors für die gebildete Menge Interferon wichtig und erreicht nach einem maximalen Wert keine weitere Steigerung. Viel wichtiger erscheint uns jedoch, daß auch eine wiederholte Gabe des Induktors keine Steigerung erbringt. Da sicherlich die Induktion von Interferon nicht die alleinige biologische Eigenschaft von RN 13 Regeneresen® ist, möchten wir daher die Induktion von Interferon als eine hervorragende Wirkung dieses Arzneimittels ansehen.

Danksagung

Wir danken dem Laboratorium Professor Dr. H. Dyckerhoff GmbH & Co., Frau Käthe Klein, für die Überlassung von RN 13 Regeneresen®.

Zusammenfassung

Verabreicht man einer Maus i.p. RN 13 Regeneresen®, so kann man nach 18 Stunden aus dem Blut eine Substanz isolieren, die das Wachstum von Viren hemmt. Diese Verbindung ist nach verschiedenen Charakteristika Interferon.

Literatur

[1] *Stewart II, W. E.:* The Interferon System. Springer-Verlag, Wien–New York (1981).
[2] *Goeddel, D. V.,* et al.: The structure of eight distinct cloned human leukocyte interferon cDNAs. Nature **290,** 20 (1981).
[3] Rote Liste (1981).
[4] *Wacker, A.:* Unveröffentlichte Versuche.
[5] *Finter, N. B.:* Dye uptake methods for assessing viral cytopathogenity and their application to interferon assays. J. gen. Virol. **5,** 419 (1969).
[6] Kälberserum (Newborn calf) Fa. Seromed®, München.
[7] Current classification of interferons. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam (1981) im Druck.
[8] siehe: Monographische Information über Regeneresen®, Fa. Müller/Göppingen, Chemisch-pharmazeutische Fabrik.
[9] *Dyckerhoff, H.:* Die Biogenese der Proteine. Ärztliche Praxis **38**, 1953 (1961).
[10] *Gidlund, M., Örn, A., Wigzell, H., Senik, A., Gresser, I.:* Enhanced NK cell activity in mice injected with interferon and interferon inducers. Nature **273** 759 (1978). – *Catalona, W. J., Ratliff, T. L., McCool, R. E.:* γ-Interferon induced by S. aureus protein A augments natural killing and ADCC. Nature **291,** 77 (1981).

(Anschrift des Verfassers: Prof. Dr. A. Wacker, Zentrum der Biologischen Chemie, Abt. für Therapeutische Biochemie, Theodor-Stern-Kai 7, 6000 Frankfurt/M.-70)

Die der „Erfahrungsheilkunde" eingeschickten Manuskripte dürfen nicht gleichzeitig anderen Zeitschriften zur Veröffentlichung angeboten werden. Im allgemeinen werden nur Arbeiten als Erstdruck angenommen. Mit der Annahme des Manuskriptes durch die Schriftleitung und den Verlag tritt der Autor sowohl das alleinige Abdrucksrecht für diese Zeitschrift als auch für andere Nachdrucke und Vervielfältigungen an den Verlag ab. Alle Rechte, auch die des Nachdruckes, der photomechanischen Wiedergabe, der Herstellung von photographischen Vervielfältigungen, Mikrofilmen u. ä. und die der Übersetzung ganz oder teilweise bleiben dem Verlag vorbehalten. Das Rahmenabkommen bzw. Fotokopien und Mikrokopien zwischen dem „Börsenverein des Deutschen Buchhandels" und dem „Bundesverband der Deutschen Industrie" vom 14. 6. 1958 ist gültig (10-Pf.-Wertmarke pro Seite).