

О.В. КАРПОВ, д-р. біол. наук,

Ю.М. ПЕНЧУК, канд. техн. наук,

О.І. СКРОЦЬКА, канд. біол. наук,

О.В. ЧЕРНЕГА, магістрант

Національний університет харчових технологій

ПАРАМЕТРИ КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН-ПРОДУЦЕНТІВ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ІНТЕРФЕРОНІВ І ТИПУ

Вивчаються основні технологічні параметри культивування клітин-продуцентів інтерферону І типу (б/в-ІФН) у створеній дослідній установці з використанням як індуктора молекулярного комплексу дріжджова РНК-гідрохлорид тилорону, іммобілізованого на гранулах Сферону-300 (ІММК). Визначено оптимальні співвідношення кількості клітин-продуцентів та частинок ІММК у середовищі культивування й оптимальні для культивування клітин швидкості перемішування культурального середовища.

Ключові слова: інтерферон, індуктор, іммобілізація, Сферон, культура клітин, ролерне культивування, мононуклеари.

Изучаются основные технологические параметры культивирования клеток-продуцентов интерферона I типа (б/в-ИФН) в созданной лабораторной установке с использованием в качестве индуктора молекулярного комплекса дрожжевая РНК-гидрохлорид тилорона, иммобилизованного на гранулах Сферона-300 (ИММК). Определены оптимальные соотношения количества клеток-продуцентов и частичек ИММК в среде культивирования и оптимальные для культивирования клеток скорости перемешивания культуральной среды.

Ключевые слова: интерферон, индуктор, иммобилизация, Сферон, культура клеток, роллерное культивирование, мононуклеары.

The basic technological parameters of cultivation of cells-producers of interferon of I type (б/в-IFN) in the framed laboratory equipment with use as an inductor of a molecular complex yeast the RNK-hydrochloride tilorone, immobilized on granules of Spherona-300 (IMMK) are studied. Parities of quantity of cells-producers and parts IMMK in the environment of cultivation and optimum for cultivation of cells of rate of liquid cultured are defined mediums optimum.

Keywords: interferon, an inductor, an immobilization, Spheron, culture of cells, scooters cultivation.

У сучасних біотехнологіях, що ґрунтуються на використанні культур еукаріотичних клітин-продуцентів біологічно активних речовин застосовують різноманітну за конструкцією апаратуру [1, 2]. Раніше нами було запропоновано принципово новий індуктор інтерферонів (ІФН) типу І: молекулярний комплекс дріжджова РНК-гідрохлорид тилорону, іммобілізований на гранулах сферону (ІММК) [3]. З метою відпрацювання технології одержання в культурах еукаріотичних клітин препаратів ІФН із використанням ІММК сконструювали й випробували дослідну установку як прототип апаратури для виробництва препаратів ІФН у промислових умовах. Метою даної роботи було встановлення основних технологічних параметрів культивування клітин в установці з використанням ІММК, а саме: 1) оптимального співвідношення кількості клітин-продуцентів ІФН та частинок ІММК у середовищі культивування; 2) оптимальної для культивування клітин інтенсивності перемішування культурального середовища.

Матеріали і методи досліджень. *Клітини-продуценти ІФН.* Досліди проводили на перещеплюваній лінії клітин тестикулів поросят (ПТП), отриманій з НДІ ветеринарії УААН (моношарова культура), та первинній культурі мононуклеарних клітин крові людини (суспензійна культура). Культивування клітин здійснювали, як описано раніше [4]. Клітини суспензійної культури (мононуклеари крові) вносили в місткості для культивування одночасно із зависсю ІММК. У разі моношарової культури ПТП клітини перед внесенням ІММК підрощували в місткостях для культивування протягом однієї доби на середовищі з 10 %-ї сироватки великої рогатої худоби (НВП «БіоТестЛабораторія», Україна) для утворення суцільного моношару на внутрішній поверхні стінок місткостей.

ІММК. Інтерферонгенний молекулярний комплекс є конструкцією на основі гранул сферону300 (Lachema, Чехія) з ковалентно приєднаними до цих гранул молекулами одноланцюгової дріжджової РНК (НПО «Біохімреактив», Латвія), інтеркальовани ми після приєднання молекулами гідрохлориду тилорону (Sigma, США). Приготування ІММК здійснювали відповідно [3, 5].

Готуючи вихідну завись ІММК, виходили з таких розрахунків. Оскільки об'єм однієї гранули сферону300 в набухшому стані становить

10—11 см³ (згідно з інструкцією виробника), приблизна кількість частинок ІММК за наших дослідних умов дорівнюватиме 7-10⁹. При цьому кількість клітин-продуцентів ІФН у вихідних клітинних зависях була на рівні

1—5·10⁶ кл/мл. Користуючись вихідною зависсю ІММК, одержували низку місткості ІММК із клітинами у певних дослідних співвідношеннях, які вносили у від повідні місткості й культивували в установці за відповідного режиму.

Дослідна установка. В основу дії створеної нами дослідної установки було покладено принцип ролерного перемішування горизонтально закріплених місткостей для культивування. Установку конструювали як універсальну, маючи на увазі можливість культивувати як моношарові, так і суспензійні культури. Опис та схему установки наведено раніше [4].

За допомогою електронного блоку здійснювали керування вихідними параметрами системи — швидкістю обертання вала та дискретністю зміни швидкості його обертання. Регулювання процесу культивування виконував оператор через персональний комп'ютер за допомогою програми BioTech v.1, що дозволяло користуватися певними режимами обертання вала впродовж фіксованих проміжків часу залежно від технологічних потреб.

Визначення кількості живих клітин у зразках здійснювали методом виключення барвника живими клітинами під час фарбування 0,1 %-м розчином трипанового синього в ізотонічному розчині NaCl згідно зі стандартною методикою [6].

Титрування ІФН у зразках проводили відповідно до стандартної методики [7], використовуючи як тест-вірус вірус везикулярного стоматиту штаму Індіана у дозі 100 ТЦД₅₀.

Результати досліджень та їх обговорення. Раніше нами було встановлено, що початковим етапом синтезу ІФН клітинами продуцентами, індукованими ІММК, є без посередній контакт їх із частинками цього інтерферогену [6]. Очевидно, що вірогідність здійснення таких контактів в умовах місткості для культивування клітин відповідатиме статистичним закономірностям і залежатиме передусім від кількості як клітин-продуцентів, так і частинок ІММК у розчині. Однак вплив зазначених контактів на життєздатність культивованих клітин та їхню спроможність продукувати ІФН є досить імовірним і водночас багато факторним феноменом, що потребує експериментальної оцінки. З огляду на це для оптимізації біосинтезу ІФН у разі використання ІММК як індуктора надзвичайно важливим є попередній дослідний підбір оптимального для інтерферогенезу співвідношення кількості клітин-продуцентів до частинок ІММК. Результати такого підбору для конкретних місткостей для культивування з відповідними об'ємними параметрами, які ми використовували (об'єм — 15 мл, внутрішня поверхня — 28 см², коефіцієнт заповнення — 0,7) [4], наведено на рис. 1.

Як видно, присутність частинок ІММК у середовищі культивування в кількостях, що перевищують кількість культивованих клітин (10/1), негативно впливає як на їхню життєздатність (рис.1, а), так і на спроможність до інтерферогенезу (рис.1, б). Це, можливо, пояснюється надлишком контактів між клітинами та частинками ІММК з відповідними необоротними порушеннями структури клітинних мембран. При цьому слід відзначити, що частинки сферону

300, на основі якого було створено IMMK, у набухшому стані мають об'єм 10—11 см³, що практично на порядок перевищує об'єм середньої еукаріотичної клітини, і тому потенційно здатні не тільки завдавати механічних ушкоджень клітинам, але й пасивно перешкоджати трансмембранному проходженню іонів та субстратів до клітини.

Близьким до оптимального за обома параметрами згадане співвідношення стає на рівні 1/10 для обох типів культур. І хоча за меншої кількості частинок IMMK у випадках обох культур спостерігалася дещо більша кількість життєздатних клітин, титри одержаного ІФН достовірно знижувалися на 7 оди ниць для лейкоцитів ($p > 0,05$) та на 3 одиниці для ПТП ($p > 0,05$) імовірно внаслідок зменшення кількості контактів IMMK з клітинами-продуцентами, які зумовлюють включення процесу індукції ІФН. Те, що зниження титрів ІФН не було пропорційним зменшенню кількості частинок IMMK у середовищі, зокрема, свідчить, що після зіткнення клітин із частинками IMMK останні не утримують клітини на своїй поверхні, а й далі вільно переміщуються у розчині, здійснюючи подальші контакти, які також спричинюють індукування ІФН іншими клітинами.

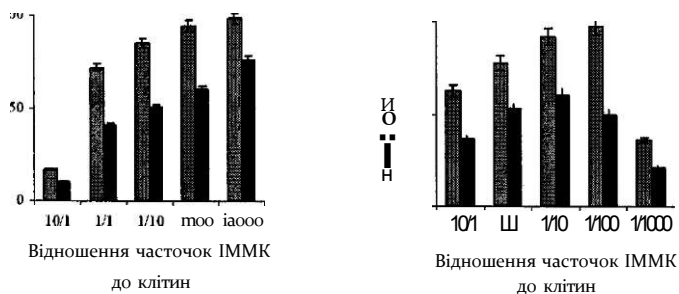


Рис. 1. Залежність життєздатності клітин (а) та виходу синтезованого ІФН (б) від співвідношення часток IMMK до клітин у ємностях для культивування: ШЯ — суспензійна культура, Ш — моношарова культура (ПТП).

Поряд з іншими впливовими факторами забезпечення життєдіяльності клітин ссавців, до яких зазвичай відносять температурний режим (у межах 36—37 °С) та рівень рН середовища (7,2—7,5), чого ми дотримувались у наших досліджах, велике значення в умовах культивування *in vitro* мають чинники, пов'язані з рухом середовища. До таких чинників, належить передусім гідродинаміка системи, яка визначає інтенсивність потоків живильного середовища. Це, у свою чергу, відбивається на життєздатності клітин, а отже й на біосинтезі культурою цільового продукту — у нашому випадку ІФН. Тому надзвичайно важливим було встановлення інтенсивності перемішування культурального середовища, оптимальної для культивування конкретних клітин у дослідній установці. Для цього вивчали залежність життєздатності клітин обох типів та інтерфероногенезу від швидкості обертання вала з розміщеними на ньому місткостями для культивування. При цьому час культивування умовно поділили на три проміжки по дві години, які наближено відповідали фазі контакту IMMK та передачі індукційного сигналу, фазі продукування ІФН і фазі початку рефрактерності.

Отримані дані наведено на рис. 2 та рис. 3. Як видно, на першому етапі культивування, коли відбувається індукування ІФН (рис. 2, а), підвищення швидкості обертання достовірно збільшувало життєздатність клітин суспензійної культури на 20—25% ($p > 0,05$) і, водночас, зменшувало її у клітин моношарової культури на 10% ($p > 0,05$) через змив із поверхні. Така сама тенденція спостерігалася й на подальших фазах культивування (рис. 2, б, в).

Що стосується синтезу ІФН клітинами, то в суспензійній культурі клітин на першому етапі культивування цей процес помітно інтенсифікувався зі збільшенням швидкості обертання вала установки на 1,5—2 одиниці. Водночас у моношаровій культурі інтерфероногенез практично не залежав від згаданого параметра (рис. 3, а). Ми вважаємо, що підвищення рівня продукування ІФН у першому випадку зумовлено збільшенням кількості контактів, які відбуваються між частинками IMMK та поверхнею клітин-продуцентів і зумовлюють запуск індукування ІФН. У

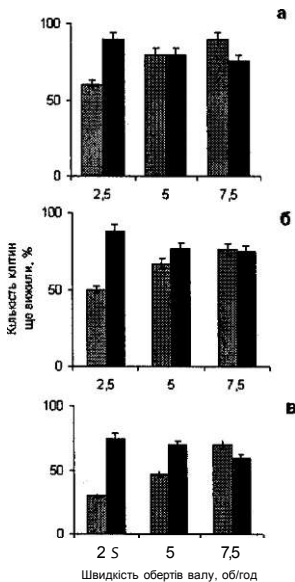


Рис. 2. Залежність життєздатності культивованих клітин від швидкості обертів валу установки упродовж фаз культивування:

а) фаза контакту ІММК та передачі індукційного сигналу, б) фаза продукції ІФН, в) фаза початку рефрактерності. □ — суспензійна культура, ■ — моношарова культура (ПТП).

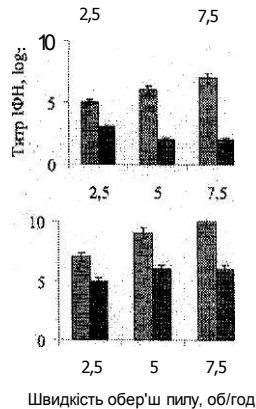


Рис. 3. Залежність продукції ІФН клітинами-продуцентами від швидкості обертів валу установки упродовж фаз культивування:

а) фаза контакту ІММК та передачі індукційного сигналу, б) фаза продукції ІФН, в) фаза початку рефрактерності. □ — суспензійна культура, ■ — моношарова культура (ПТП).

разі ж моношарової культури кількість таких контактів практично не змінюється, оскільки її обмежує кількість клітин-продуцентів ІФН, що містяться на зовнішній поверхні моношару.

Висновки. Підсумовуючи, слід наголосити, що результати проведеного дослідження свідчать про важливість підбору основних технологічних параметрів культивування клітин продуцентів ІФН за своєрідних умов технології з використанням гранул ІММК як інтерферону. Вочевидь, застосування більш об'ємної апаратури для культивування клітин і, відповідно, потужніших пристроїв для перемішування культурального середовища (лопатевих і турбінних мішалок або імперелів різних конструкцій) потребуватиме в кожному разі окремого визначення оптимальних співвідношень кількості клітин-продуцентів та частинок ІММК у середовищі, а також оптимальної швидкості перемішування. При цьому правильне визначення цих параметрів прямо впливатиме на продуктивність використання біореакторів для одержання препаратів ІФН у виробничих умовах за такою технологією.

ЛІТЕРАТУРА

1. Nelson K.L., Geyer S. Bioreactor and process design for largescale mammalian cell culture manufacturing // Bioprocess Technol. — 1991. — V.13. — P. 112—143.
2. Runstadler P W. The importance of cell physiology to the performance of animal cell bioreactors // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 1992. — V. 665. — P. 380—390.
3. Карпов А В., Пенчук Ю.Н., Вережка С.В. Применение иммобилизованных индукторов в технологии получения природных интерферонов I типа в культурах клеток. Использование гранулярных носителей // Биотехнология. — 2006. — №1. — С. 30—35.

4. Пенчук Ю.М., Карпов О.В., Поводзинський В.М. та ін. Оцінка ефективності дослідної установки для одержання інтерферонів I типу // Біотехнологія. — 2008. — № 1. — С. 80—85.
5. Карпов О.В., Верьовка С.В., Манджос О.П. та ін. Індукція інтерферонів I типу в умовах *in vitro* за допомогою іммобілізованого комплексного інтерфероногену // Доп. НАН України. — 2003. — №9. — С. 178—181.
6. Doyle A., Griffiths J. Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology. — John Willey and Sons, 1998. — 332 p.
7. Ершов Ф.И., Новохатский А.С. Интерферон и его индукторы. — М.: Медицина, 1980. — 193с.

Одержано редколегією 10.03.2011 р.