



Ю.М. Пенчук, В.М. Поводзинський, О.В. Карпов

Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

КОНСТРУЮВАННЯ ТА ВИПРОБУВАННЯ ІММОБІЛІЗОВАНОГО КОМПЛЕКСНОГО ІНДУКТОРУ α/β -ІНТЕРФЕРОНІВ

Вивчалися фізичні та біологічні параметри інтерферогенних молекулярних конструкцій, що являють собою комплекси дріжджової РНК з гідрохлоридом тилорону, ковалентно приєднані до гранулярних носіїв. Показано, що за дослідженими параметрами найбільше відповідають технологічним умовам великомасштабного виробництва інтерферону комплекси на основі Сферону 300.

Изучались физические и биологические параметры интерферогенных молекулярных конструкций, представляющих собой комплексы дрожжевой РНК с гидрохлоридом тилорона, ковалентно присоединенные к гранулам носителей. Показано, что по исследованным параметрам наиболее отвечающими технологическим условиям крупномасштабного производства интерферона являются комплексы на основе Сферона 300.

This paper deals with some physical and biological parameters of interferonogenic molecular constructions, being yeast RNA complexes with tilorone hydrochloride; these complexes are covalently linked to carrier granules. The parameters studied show the complexes based on Spheron 300 are the most adequate for large-scale interferon production.

У сучасній лікарській практиці широко застосовуються препарати α/β -інтерферонів (α/β -ІФН). Ключовим етапом біосинтезу цих біологічно активних білків є їх індукція, тобто позаклітинна активація відповідних генів. У зв'язку з цим завдання створення індукторів їх синтезу, які відповідали б максимуму вимог сучасного фармацевтичного виробництва, насамперед таких, як дешевизна та спрощена технологія застосування, є доволі актуальним. Індуктори α/β -ІФН, що використовуються нині, – деякі віруси, а також природні та синтетичні дволанцюгові РНК (длРНК) – не повністю відповідають цим вимогам: препарати длРНК дорогі, а застосування вірусів як індукторів потребує додаткових трудомістких етапів очистки отриманих препаратів ІФН.

Раніше була доведена принципова

можливість індукції α/β -ІФН в умовах *in vitro* за допомогою молекулярної конструкції (МК), що складається з одностанцюгової дріжджової РНК, ковалентно приєднаної до нерозчинного носія, та гідрохлориду тилорону [1, 2]. Останній, утворюючи комплекс з РНК, стабілізує фрагменти її дволанцюгової структури, які, власне, і справляють інтерферогенну дію.

Мета нашого дослідження полягала у створенні ефективних препаратів МК, іммобілізованих на нерозчинних матрицях (ІММК), і випробування таких молекулярних конструкцій як інтерферогенів.

Матеріали і методи. У досліджах використовували комерційний препарат дріжджової РНК (рибосомальна фракція) (НПО "Біохімреактив", Латвія). Як носії застосовувалися Сефадекс G-50 та

НОВІ ТЕХНОЛОГІЇ У БІОЛОГІЇ ТА МЕДИЦИНІ

Сефароза 4В ("Pharmacia", Швеція), а також Сферон 300 (LC 63 – 100 мм, "Lachema", Чехія). РНК ковалентно пришивали до гранул носіїв ціанбромідним методом [3]. Остаточний вміст РНК на носіїв визначали як балансним розрахунком, так і за допомогою кольорової реакції з орциновим реактивом [4]. В отриманих препаратах він становив $30 \pm 2,8$ мкг РНК/мл носія. Такі препарати далі інкубували в 0,05 М розчині гідрохлориду тилорону ("Sigma", США) у буфері, що містив 0,01 М трис-НСІ (рН=6,8) протягом 1 год, після чого отриманий у такий спосіб ІММК відділяли від розчину фільтрацією на нутч-фільтрі.

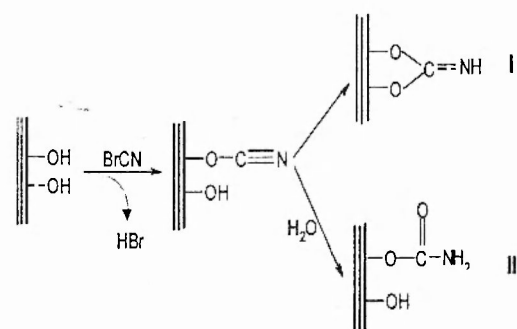
Визначення інтерферогенних властивостей усіх досліджуваних препаратів ІММК проводили на первинній культурі мононуклеарних лейкоцитів людини, які виділяли з периферійної крові І(0) групи в градієнті фікол-урографін (р=1,077) згідно зі стандартною методикою [5], а також на клітинній лінії перевивних тестикулів поросят (ПТП). Клітини культивували відповідно до загальноприйнятого методу [6], використовуючи живильне середовище 199 (НВП "Біо-Тест-Лабораторія", Україна) з додаванням 5 – 10%-ї ембріональної сироватки телят ("Serba", США), 25 мМ/мл 4-(2-гідроксиетил)-1-піперазіноетансульфонової кислоти (HEPES) ("Serba"), 10 мМ/мл L-глутаміну та антибіотиків – пеніциліну та стрептоміцину або канаміцину в загальноприйнятій дозах при 37°C і 5%-му вмісті діоксиду вуглецю в газовій фазі. Клітини культивували у 24-лункових пластикових планшетах "Falcon" (США). Для визначення інтерферогенної дії ІММК та іммобілізованих стандартних індукторів їх концентровані зависі додавали до суспензії клітин зі щільністю 1×10^6 клітин/мл середовища. Титрування ІФН у зразках проводили згідно зі стандартною методикою [9], використовуючи

тест-вірус – вірус везикулярного стоматиту штаму Індіана у дозі 100 ТЦД₅₀.

Результати та їх обговорення. Першим етапом дослідження стало отримання ряду індукторних систем шляхом ковалентного зв'язування біополімерів із синтетичними носіями для подальшого порівняльного використання як високомолекулярного компонента комплексного індуктора інтерферону.

За умов активації досліджуваних нами носіїв взаємодія BrCN у водному середовищі з двома сусідніми гідроксилами матриці через нестійкий проміжний ціанат приводить до утворення активного імідокарбонату (I), а також неактивного карбамату (II):

Відомо, що дана реакція активації відбувається тільки в достатньо лужному середовищі, що безперервно закислюється HBr, який вивільняється [7]. Тому в ході реакції ми періодично додавали 0,1М гідрокарбонат натрію (рН=9,5). Реакція є екзотермічною, тому реакцій-



ну суміш постійно охолоджували.

У реакцію з активованою матрицею теоретично може вступити будь-яка з хімічно еквівалентних груп РНК – аміногрупи нуклеїнових основ, гідроксили цукрів та ін. Однак у разі наявності в одностанцюговій РНК двостанцюгових структур з частковою комплементарністю основ у них аміногрупи таких основ будуть важче вступати в реакцію з активними групами матриці, ніж вільні аміногрупи одностанцюгових ділянок молекул РНК. Ця обставина враховувалася

при інтерпретації даних щодо концентрації ДНК, зафіксованої на матрицях.

Отримані іммобілізовані конструкції випробовували, використовуючи клітини як моношарової (ПТП) та суспензійної (мононуклеарні лейкоцити крові людини) культур.

Загальні характеристики препаратів ІММК, іммобілізованої на різних гранулярних носіях, наведені в табл. 1.

Як видно з наведених даних, кількість РНК, яку вдається ковалентно приєднати до носіїв, що застосовувалися у досліді, істотно не відрізняється. Однак при цьому інтерферогенна властивість отриманих ІММК варіює у досить великих межах. Найбільшу активність у наших дослідіх мала ІММК на основі Сферону 300.

Слід відмітити також і те, що найбільшу інтерферогенну дію всі конструкції справляли в культурі лейкоцитів. Дані наших дослідів не дозволяють однозначно відповісти, пов'язаний вказаний ефект з фізіологією досліджуваних клітинних культур, або ж з

перевагами застосування ІММК саме в умовах суспензійної культури.

Передбачається, що ІММК буде використовуватися у декількох повторних циклах біосинтезу ІФН з частковою регенерацією шляхом відновлення кількості тилорону, зв'язаного з РНК на носії. Тому в подальшому ступінь деградації ІММК оцінювали упродовж 6 послідовних циклів їх використання. Результати наведено в табл. 2.

Наведені дані свідчать, що впродовж послідовних циклів експлуатації ІММК на основі усіх досліджуваних носіїв відбувається як зменшення їх об'ємів, що вдається отримати після очистки від клітин та клітинних залишків, так і деградація РНК, ковалентно приєднаної до носіїв. При цьому ІММК втрачається на всіх носіях майже однаковою мірою. Водночас найбільше РНК деградує на найнестійкішому носіїві – Сефарозі 4В, а найменше – на стійкому Сфероні 300. Це, у свою чергу, відбивається на здатності відповідних ІММК індукувати в подальшому ІФН (табл.2).

Таблиця 1.

Характеристики ІММК, іммобілізованого на гранулярних носіях

Носій	Розмір часток, мкм	Вміст РНК, мкг/мл завису *	Інтерферогенна спроможність, $\log^2/10^6$ клітин *	
			ПТП	Лейкоцити
Сефадекс G-50	50 – 150	$24,6 \pm 1,2$	$2,20 \pm 0,11$	$4,28 \pm 0,21$
Сефароза 4В	60 – 140	$29,3 \pm 2,3$	$2,29 \pm 0,11$	$4,71 \pm 0,23$
Сферон 300	63 – 100	$31,8 \pm 2,6$	$3,50 \pm 0,17$	$5,24 \pm 0,26$

* Вміст РНК та титри індукованого ІФН визначали під час першого циклу використання ІММК. Наведено дані 4 дослідів

НОВІ ТЕХНОЛОГІЇ У БІОЛОГІЇ ТА МЕДИЦИНІ

Таблиця 2.
Деградація ІММК упродовж послідовних циклів їх використання і регенерації

Носій	Об'єм ІММК, який вдається отримати після очистки, % внесеної кількості	Деградація нуклеїнового компонента ІММК після контакту з клітинами, %*	Зменшення інтерферогенної спроможності ІММК (%)*	
			ПТП	Лейкоцити
Сефадекс G-50	63,4	7,9	28	36
Сефароза 4В	61,1	11,4	32	35
Сферон 300	64,3	5,8	22	20

* Величини оцінювали, як різницю між відповідними показниками 1 та 6 циклів використання ІММК

Така тенденція, на наш погляд, може пояснюватися комплексом обставин. Відомо, що гідроксильні групи сферонів, які є гідрофільними оксіалкілметакрилатними гелями, за своїми властивостями аналогічні гідроксилам агарози та сефадексів. Саме ці групи й активуються бромціаном і до них приєднуються ліганди та спейсери [8]. Однак при цьому завдяки вільнішій орієнтації полінуклеотиду, ковалентно закріпленого на носіях типу сферонів, порівняно з іншими, саме закріплення відбувається більш повно і не впливає на реакції, в яких цей

полінуклеотид бере участь далі [9]. До того ж на відміну від інших носіїв, які ми випробовували, Сферон 300, як і інші сферони, достатньо жорсткий, хімічно стійкий і не руйнується мікроорганізмами [7], що теж знайшло своє відображення в поліпшених параметрах препаратів РНК, іммобілізованої на цьому носії.

Підсумовуючи, слід зазначити, що загалом ІММК на основі Сферону 300 можна вважати перспективними індукторними молекулярними конструкторними для отримання препаратів α/β -ІФН в промислових умовах.

1. Карпов О.В., Вєрьовка С.В., Манджос О.П. та ін. Індукція інтерферонів І типу в умовах *in vitro* за допомогою іммобілізованого комплексного інтерферогену // Доп. НАН України. – 2003. – №9. – С.178 – 181.
2. Жолобак Н.М., Манджос А.П., Вєрєвка С.В. и др. Інтерферогенне действие іммобілізованих рибополінуклеотидов *in vitro* // Укр. біохим. журн. – 2003. – т. 75, №6. – С.106 – 110.
3. March S.C., Parikh I., Cuatrecasas P., A simplified method for cyanogen bromide

activation of agarose for affinity chromatography // Anal. Biochem. – 1974. – V. 60. – P.149. – 152.

4. Методы исследования нуклеиновых кислот / Под ред. А.Н. Белозерского. – М.: Мир, 1970. – 277 с.
5. Иммунологические методы исследований / Под ред. И. Лефковитса, Б. Пернуса. – М.: Мир, 1988. – С. 232. – 240.
6. Культуры животных клеток / Под ред. Д. Фреша. – М.: Мир, 1989. – 332 с.
7. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. – М.:



- Наука, 1985. – 536 с.
8. Туркова Я. Аффинная хроматография. – М.: Мир, 1980. – 471 с.
9. Bunemann H., Westhoff P., Herrmann R.C. Immobilization of denatured DNA to macroporous supports: I. Efficiency of different coupling procedures // Nucl. Acid Res. – 1982. – V.10. – P. 7163 – 7180.

Про авторів

ПЕНЧУК Юрій Миколайович — аспірант кафедри біотехнології мікробного синтезу Національного університету харчових технологій.

Тел.: 8-067-440-44-98.

ПОВОДЗИНСЬКИЙ Вадим Миколайович — кандидат технічних наук, доцент кафедри біотехнології мікробного синтезу Національного університету харчових технологій.

КАРПОВ Олександр Вікторович — доктор біологічних наук, доцент кафедри біотехнологій мікробного синтезу Національного університету харчових технологій.

А ЗНАЕТЕ ЛИ ВЫ...

Стресс неблагоприятно действует на работу нервной системы, на иммунную защиту, на гормональную регуляцию и многие другие функции организма. В период осенне-зимних эпидемий гриппа человек обычно заболевает не при первой же встрече с вирусом, а через день-другой после перенесенного стресса. Первая реакция – это выброс гормона адреналина, который вызывает учащение дыхания и сердцебиения, сужение сосудов и увеличение их тонуса. Таким образом организм готовится принять неожиданную опасность и обеспечить свои клетки повышенным количеством питания и кислорода.

Шведские ученые пришли к выводу, что люди с более низкими показателями интеллекта в большей степени склонны к самоубийствам, пишет British Medical Journal. Были изучены результаты психологических тестов 987308 молодых шведов, поступавших на военную службу в возрасте 18 лет. Тесты исследовали логическое и пространственное мышление, языковые и технические навыки.

Затем прослеживалось состояние данных военнослужащих в течение 5 – 26 лет.

За это время 2811 человек свели счеты с жизнью. Максимальный риск суицидов – в два-три раза – оказался у людей с худшими результатами тестирования. Особенно это относится к тестам на логическое мышление – со снижением балла, по которому оценивался тест, всего на один пункт риск суицида возрастал на 12 процентов.

Более высокие показатели интеллекта свидетельствуют о более высокой способности справляться с возникающими жизненными проблемами, а нарушения когнитивных функций мозга может свидетельствовать о склонности к развитию различного рода психических отклонений, при которых частота суицидов достоверно выше.

Следует заметить, что в России по признанию экспертов, от суицидов ежегодно погибают около 60 тысяч человек, а их частота в 2 раза превышает "критический уровень", установленный Всемирной организацией здравоохранения, при этом у мужчин этот уровень в 6 раз выше, чем у женщин. А показатели заболеваемости психическими расстройствами за последние 10 лет увеличились в Российской Федерации на 41,5 процента.