

УДК 578.245:577.113.7:57.086.833

А.В. Карпов, Н.М. Жолобак

Изучение интерферогенных свойств комплексов дрожжевая РНК тилорон в культуре клеток

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

2,7-бис [2-(диэтиламино-этокси)-флуорен]-9-он дигидрохлорид (тилорон) [7] известен как противовирусное соединение широкого спектра действия [8], что обусловлено его способностью индуцировать интерферон в организме [2, 4]. Показано, что этот препарат обладает высокой специфичностью связывания с нуклеиновыми кислотами клетки [2, 5].

Целью данной работы явилось изучение способности к интерферогенезу в условиях *in vitro* молекулярных комплексов, образующихся в растворе при связывании дрожжевой РНК с тилороном, и установление физиологических параметров данного процесса.

Материал и методы

В работе использовали коммерческий препарат дрожжевой РНК (НПО «Биохимреактив», Олайна, Латвия), который дополнительно очищали трехкратной фенольной депротеинизацией с последующим осаждением этанолом согласно стандартной методике [1]. Молекулярные комплексы (МК) готовили прямым смешиванием растворов дрожжевой РНК в буферном растворе, содержащем 0,01 М трис-НСI-буфер (рН 6,8) и 0,05 М NaCl с раствором тилорона («Sigma», США) заданной концентрации в том же буфере.

Растворы МК предварительно стерилизовали путем фильтрования через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мк («Сынпор», ЧСФР) и далее вносили в культуру клеток в дозах и соотношениях компонентов, соответственно каждому отдельному опыту.

Для сравнительной оценки индукторного эффекта МК использовали стандартные индукторы α/β -ИФН: ларифан (лекарственная форма препарата дсРНК бактериофага F2, Инсти-

тут микробиологии им. Августа Кирхенштейна, Латвия) и poly(I)—poly(C) («Calbiochem», США). Данные индукторы вносили в культуру в виде растворов в указанном выше буфере в концентрациях и дозах, обеспечивавших, согласно литературным данным, максимальный индукторный эффект.

Опыты по изучению интерферогенного действия МК проводили на клетках мышц культуральной линии L929, которые выращивали согласно стандартной методике.

Уровень экзогенного ИФН определяли в культуральной среде через 24 часа после начала контакта клеток с индукторами. Титрование ИФН проводили в гомологичной культуре на 96-луночных панелях согласно стандартной методике, используя в качестве тест-вируса вирус везикулярного стоматита (ВВС) штамм Индиана в дозе 100 ТЦД₅₀.

Токсичность МК определяли после 24 часов инкубации по количеству живых клеток с помощью 0,2% раствора трипанового синего.

Результаты и обсуждение

Проведенные нами сравнительные исследования интерферогенной активности комплексов, образующихся при взаимодействии дрожжевой РНК с тилороном, показали (таблица), что данные комплексы способны индуцировать ИФН в культуре клеток на уровне титров известных индукторов ИФН и к тому же в дозе, вдвое меньшей, чем дозы последних.

Особо следует отметить то обстоятельство, что сами по себе компоненты МК — как РНК, так и тилорон, в данных экспериментальных условиях и дозах, соответствующих их содержанию в МК, индукторного действия практически не оказывают, что пол-

Таблица
 Продукция интерферона культурой клеток L929 под действием МК и стандартных индукторов

Вносимый индуктор	Доза, мкг/10 ⁶ клеток	Титр интерферона, log ₂
МК**	25,0	6,4
Тилорон***	2,2	0
РНК дрожжевая***	22,3	2,0
Ларифан****	50,0	4,8
poly (I)-poly (C)****	50,0	6,2
Контроль	0	0

Примечания. * Титры интерферона определяли через 24 часа после внесения индуктора; ** соотношение тилорон/РНК (фосфат) — 1/10; *** доза соответствует таковой в составе МК; **** доза соответствует рекомендованной для получения индукторного эффекта.

ностью соответствует данным литературы [2, 8].

Параллельно проводили оценку возможной токсичности препаратов МК в интервале использовавшихся нами доз (5—100 мкг/10⁶ клеток). Оказалось, что МК в таких концентрациях не влияли на жизнеспособность клеток и не вызывали цитодеструктивных изменений при контакте до 24 часов.

В результате внесения МК в культуру клеток L929 со временем происходит значительное и пролонгированное накопление ИФН в питательной среде (рис. 1). При этом максимум интерферогенеза приходится на 6-й час после контакта МК с клетками. Далее титры ИФН в среде остаются практически без изменений на протяжении 24 часов (время наблюдения). Таким образом, по динамическим параметрам действие препаратов МК в культуре клеток L929 полностью совпадает с действием индукторов полирибонуклеотидной природы (максимум продукции ИФН — 5—6 часов) [2, 9].

С целью выбора оптимальных условий биосинтеза ИФН в культуре под действием МК изучали влияние соотношения их компонентов на интерферогенез (рис. 2). Оказалось, что наиболее оптимальным соотношением явилось молярное соотношение тило-

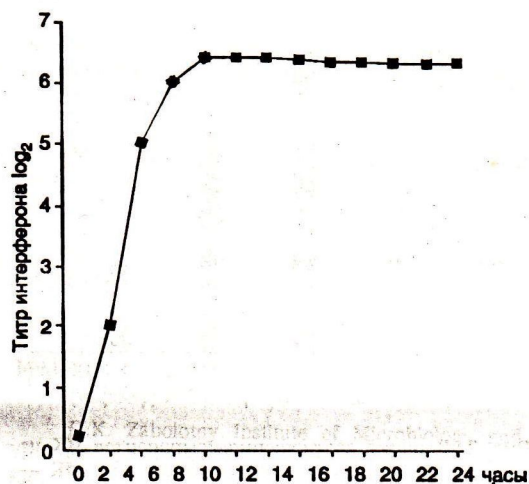


Рис. 1. Накопление интерферона в культуральной среде клеток L929 под действием МК (доза МК и соотношение его компонентов аналогичны указанным в таблице)

рона к фосфату РНК 1:10 (т.е. одна молекула тилорона на 5 пар комплементарных оснований для двуспиральной структуры). Характерно, что увеличение содержания тилорона в комплексах приводило к резкому снижению интерферогенной способности последнего. Это, по нашему мнению, может отражать токсическое действие данной концентрации тилорона на клетки, отмечаемое в литературе [8].

Исходя из найденного оптимального соотношения компонентов МК изучали зависимость интерферогенеза в культуре от вносимой дозы данного индуктора (рис. 3). Наиболее выраженный интерферогенный эффект наблюдался при использовании МК в дозе 25 мг/10⁶ клеток (относительно нуклеинового компонента комплекса). Указанная величина практически совпадает с оптимальными дозами рибонуклеиновых индукторов, используемыми при биосинтезе ИФН *in vitro* [2].

Культуральную жидкость, содержащую в определенных титрах ИФН, подвергали инкубации при 60°C на протяжении 30 мин, а также подкисляли до pH 2,0 в течение 24 часов, после чего вновь определяли титры ИФН. Оказалось, что величины титров ИФН после воздействия указанных факторов практически не меня-

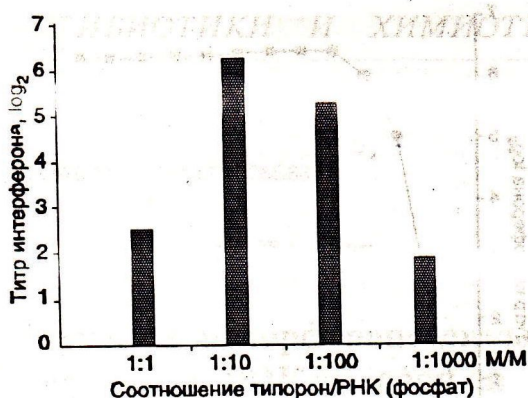


Рис. 2. Влияние соотношения компонентов МК на уровень интерферонеза (вносимая доза МК — 25 мкг/10⁶ клеток, титры ИФН определяли через 6 часов от начала контакта МК с клетками)

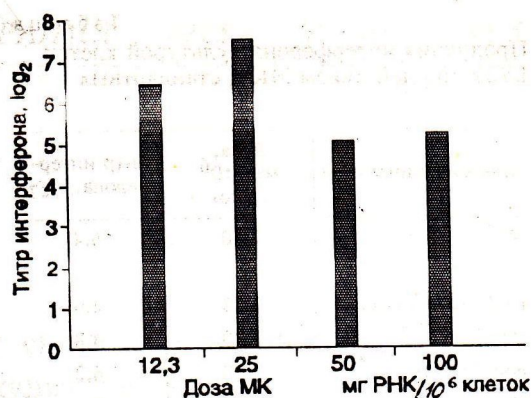


Рис. 3. Зависимость синтеза интерферона клетками L929 от дозы МК (соотношение компонентов МК — 1:10 (M/M тилорона/фосфат РНК))

ются. Это дало основание считать, что полученный ИФН принадлежит к ИФН I типа (α/β -ИФН).

Таким образом, в опытах *in vitro* нами показана способность молекулярных комплексов, образуемых при связывании дрожжевой РНК с тилоронном, служить индуктором синтеза ИФН клетками. Механизм данного феномена может состоять в том, что при комплексообразовании один из компонентов МК, а именно дрожжевая РНК, претерпевает некоторые структурные изменения, приводящие к приобретению ею способности к интерферонезу.

Известно, что интерферогенная способность индукторов рибонуклеиновой природы зависит как от содержания в составе их мономерных компонентов рибозы и, частично, от состава их оснований, так и от вторичной структуры этих полимеров — достаточного количества двуспиральных участков, имеющих, к тому же, повышенную термодинамическую стабильность и относительную стойкость к действию РНКаз [9]. Что же касается коммерческих препаратов дрожжевой РНК, использовавшихся в наших опытах, то они, как известно, состоят преимущественно из фракции рибосомальной РНК и поэтому не содержат в своей структуре стабильных крупных двуспиральных участков, в силу чего являются очень плохими индукторами ИФН [2].

Второй компонент комплексов — тилорон, как установлено, связывается в растворах с ДНК путем интеркаляции своего гетероциклического хромофора между парами оснований [5, 6]. В случае одонитовой РНК в растворе, вследствие тепловых флуктуаций, ее структура все время находится под действием динамических изменений — образования и распада большого количества участков с частичной комплементарностью [3]. В этих условиях тилорон, интеркалируя между парами оснований вновь образованных двуспиральных участков, сдвигает динамическое равновесие системы именно в сторону накопления указанных двуспиральных фрагментов, выступая в роли своеобразного «закрепителя» двуспиральной структуры РНК. Известно, что комплексы нуклеиновых кислот с интеркаляторами имеют повышенную термодинамическую стабильность и стойкость к нуклеазам [3]. Именно эти стабильные двуспиральные участки комплексов РНК—тилорон действуют, вероятно, как интерфероген в описанных выше условиях.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что молекулярные комплексы дрожжевой РНК с тилоронном оказывают существенное интерферониндуцирующее действие *in vitro*, сравнимое с таковым известных интерферогенов полирибонуклеотидной природы и могут, наряду с

последними, найти в дальнейшем применение при крупномасштабном производстве ИФН первого типа (α/β -ИФН).

8. *Stringfellow D.A.* // Interferons and their applications. / *Came P.E., Carter W.A., Eds.* — Berlin, Springer-Verl., 1984. P. 371—383.
9. *Torrence P.T., De Clercq E.* // *Ibid.* — P. 233—258.

Поступила 21.03.95

Литература

1. Методы исследования нуклеиновых кислот / Под ред. А.Н. Белозерского. — М.: Мир, 1970. — 277 с.
2. *Садыков А.С., Ершов Ф.И., Новохатский А.С.* и др. Индукторы интерферона. — Ташкент, Фан, 1978. — 303 с.
3. *Фрайфелдер Д.* Физическая биохимия. — М.: Мир, 1980. — 582 с.
4. *Чижов Н.П., Борисова М.А.* // Антибиотики и мед. биотехнол. — 1987. — №9. — С. 706—715.
5. *Chandra P., Zunino F., Gaur V.P. et al.* // *FEBS Lett.* — 1972. — Vol. 28, No. 1. — P. 5—9.
6. *Chandra P., Zunino F., Zaccara A. et al.* // *Ibid.* — Vol. 23, No. 2. — P. 145—148.
7. *Krueger R.F., Mayer G.D.* // *Science.* — 1970. — Vol. 169. — P. 1213—1214.

A.V. Karpov, N.M. Zholobak

STUDY OF INTERFERONOGENIC PROPERTIES OF YEAST RNA AND THYLORON COMPLEXES IN CELL CULTURE

D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of the Ukraine, Kiev

The use of molecular complexes of yeast RNA with thyloron as inducers of type I interferons (α/β -interferons) in the culture of cells L929 is described. It was shown that the complexes induced the interferon synthesis in the cells at the level comparable to that of the standard inducers of the polyribonucleotide nature i.e. larifan and poly(I)-poly(C). In the experimental doses the complexes proved to be nontoxic. It was concluded that the use of the yeast RNA and thyloron complexes as inducers in large-scale production of type I interferons was promising.