

УДК 577.245:615.275+578.23.001

Н. Жолобак, канд. біол. наук, Ю. Пенчук, асист.,
О. Карпов, д-р біол. наук, О. Молчанець, канд. біол. наук

ОСОБЛИВОСТІ ПРОДУКЦІЇ ІНТЕРФЕРОНІВ У КУЛЬТУРІ КЛІТИН З ВИКОРИСТАННЯМ КОМПЛЕКСНОГО ІНДУКТОРА

Вивчено вплив праймінгу на біосинтез α/β -інтерферонів культурою клітин ПТП з використанням як індуктора інтерферогенного молекулярного комплексу дріжджова РНК – тилорон (МК), а також залежність індукційної дії МК від строку зберігання. Отримані дані за вказаними параметрами дозволяють віднести МК до перспективних індукторів, придатних до використання при промисловому отриманні препаратів природних α/β -інтерферонів.

A priming influence onto α/β -interferons biosynthesis by PTC culture with the aim of a molecular complex yeast RNA-tilorone (MC) and a dependence of MC inductive effect from storage terms were studied. Obtained results let to assume the MC a perspective inducer for industrial production of natural α/β -interferons

Вступ. Незважаючи на доволі широке використання в клінічній практиці препаратів рекомбінантного інтерферону (ІФН), аналогічні натуральні препарати не втратили свого значення внаслідок наявності у них деяких унікальних фізіологічних властивостей [1]. Тому отримання ІФН природного походження є достатньо актуальним для фармацевтичної промисловості нашої країни. В умовах широкомасштабного виробництва ІФН ефективність його отримання обумовлює вдало підібране поєднане використання тих чи інших клітин-продуцентів і відповідного ефективного індуктора – агента, що стимулює клітини до інтерферогенезу. У зв'язку з цим актуальним є також пошук і створення принципово нових індукторів синтезу ІФН, які відповідали б максимуму вимог сучасного фармацевтичного виробництва, у першу чергу – таких як дешевизна та спрощена технологія застосування за наявності інтенсивного виходу цільового продукту. Одним з технологічних прийомів, що використовується для підсилення інтерферогенної дії індукторів є праймінг – попередня доіндукційна обробка клітин препаратами гомологічного ІФН. Ще однією бажаною властивістю потенційних препаратів-індукторів є їхня стійкість – здатність зберігати біологічні властивості на протязі тривалого часу [7].

Раніше на деяких клітинних моделях була показана здатність молекулярного комплексу дріжджової РНК з 2,7-біс[2-(діетиламіно-етокси)-флуорен]-9-он дигідрохлоридом (тилорон) викликати продукцію α/β -ІФН на рівні відомих індукторів полірибонуклеотидної природи [2; 4], що дало можливість розглядати його як перспективний технологічний індуктор. Ураховуючи вимоги великомасштабного виробництва до препаратів-інтерферогенів, важливим було дослідити дію МК у поєднанні з праймінгом, а також тривалість збереження його індукційної здатності, що й склало мету даної роботи.

Матеріали й методи. Молекулярний комплекс дріжджова РНК – тилорон (МК) готували згідно з роботою [4]. Його компонентами були: комерційний препарат дріжджової РНК ("Біохімреактив", Латвія) і тилорон гідрохлорид ("Sigma", США). Як препарати порівняння використовували індуктори ІФН poly(I)-poly(C) ("Calbiochem", США) і ларифан (лікарська форма дволанцюгової РНК бактеріофагу f2, Інститут мікробіології ім. А. Кірхенштейна, Латвія).

Оцінку інтерферогенезу проводили на культурі перещеплюваної лінії тестикулів поросят (ПТП) (НДІ ветеринарії НАСГН України, Київ). Клітини культивували за методикою, описаною у роботі [5] на середовищі 199 з додаванням до них 5–10 % сироватки те-

лят ("Serva"), 25 мМ HEPES, 10 ммоль/л глютаміну та антибіотиків – пеніциліну й стрептоміцину (по 100 од./мл кожного) [7].

Праймінг здійснювали, обробляючи культуру клітин за 3 год до індукції препаратом ІФН ("Лаферон", НПК "ФармБіотек", м. Київ) у кінцевій концентрації 12,5 міжнародних одиниць (МО) в 1мл. Рівень ІФН у зразках культуральної рідини визначали через 24 год після внесення індуктора відповідно до загальноприйнятої методики [7], використовуючи тест-вірус – вірус везикулярного стоматиту штаму Індіана в дозі 100 ТЦД₅₀. Цитопатичні ефекти вірусів у культурах клітин реєстрували візуально, проглядаючи досліджувані культури у світловому інвертованому мікроскопі "Біолам П-1" (ЛОМО, Росія) при збільшенні 35x та 100x. За титр ІФН брали величину максимального розведення проби, за якої спостерігався 50 %-й захист клітин від цитопатичної дії тест-вірусу. Активність індукованого ІФН розраховували за формулою

$$A_{зр} = T_{зр} \times A_{ст} / T_{ст}, \text{ (МО/мл)}$$

де $T_{зр}$ – титр ІФН у досліджуваному зразку, $T_{ст}$ – титр ІФН стандартного препарату ІФН- α , $A_{ст}$ – активність стандартного препарату ІФН- α . Як стандарт використовували препарат "Лаферон" з питомою активністю не менше 2×10^8 МО в 1 мг лікарської форми рекомбінантного ІФН людини (НПК "ФармБіотек", м. Київ).

Результати та їх обговорення. Промислове виробництво ІФН вимагає як використання індукторів, що дають інтенсивний вихід препарату, так і додаткових методичних операцій, які можуть суттєво стимулювати індукцію ІФН культурах клітин. Феномен праймінгу – попередньої обробки клітин тварин невеликими дозами ІФН, що приводить до підвищення продукції власного ІФН у відповідь на наступну індукцію його синтезу – спостерігається майже в усіх системах клітина – індуктор. Праймінг використовується як спосіб суттєвого збільшення кількості ІФН у відносно малопродуктивних системах. У великомасштабному виробництві α - і β -ІФН його широко використовують для збільшення виходу кінцевого продукту. Вираженість ефекту праймінгу великою мірою залежить від природи індуктора, що застосовується в тій чи іншій клітинній системі. Результати застосування праймінгу за умов використання МК і стандартних індукторів інтерферогенезу полінуклеотидної природи наведені в табл. 1.

Таблиця 1. Продукція ІФН культурою клітин ПТП під дією МК та індукторів порівняння

Індуктор	Доза, мкг/мл	Активність ІФН МО/мл	
		Без праймінгу	З праймінгом
МК	25,0	251,2 ± 12,3	421,0 ± 18,1
Ларифан	50,0	323,7 ± 1,51	465,3 ± 11,7
<i>Poly(I)-poly(C)</i>	50,0	319,3 ± 0,63	472,0 ± 16,1
Контроль	0	0	0

Як видно з наведених даних, використання праймінгу як прийому для інтенсифікації інтерферогенезу в усіх випадках приводить майже до пропорційного збільшення продукції ІФН клітинами лінії ПТП. При цьому вказане явище виявилось характерним для всіх використаних індукторів, включаючи й досліджуваний нами МК. Слід зауважити, що концентрація МК, як і інших індукторів, підбиралася в досліді у відповідності до їхніх оптимальних співвідношень з клітинами-

продуцентами, за яких спостерігається найбільший інтерферогенний ефект [2; 4].

Іншим важливим технологічним показником препаратів індукторів є тривалість збереження їхньої специфічної здатності викликати продукцію ІФН. З цією метою було досліджено розчини препаратів МК, які зберігали в морозильному відділенні холодильної камери при температурі $-5...-10^{\circ}\text{C}$. Результати визначення індукційної здатності розчинів МК різного строку зберігання наведено на рис. 1.

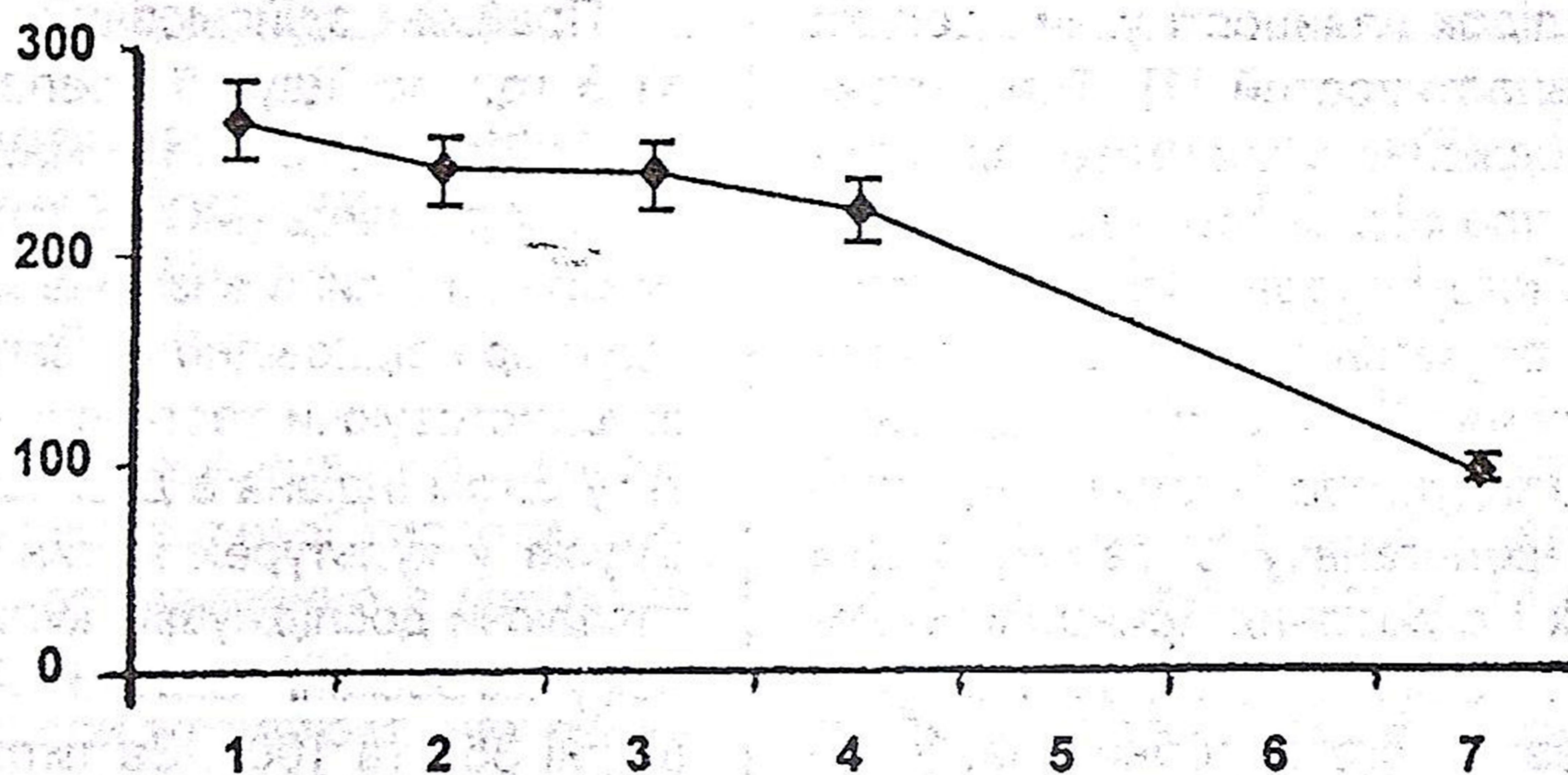


Рис. 1. Інтерфероніндукуюча здатність МК у культурі клітин ПТП залежно від строку зберігання (дані чотирьох дослідів): по осі абсцис – строк зберігання МК (рік); по осі ординат – активність індукovanого ІФН (МО/мл)

З наведених даних видно, що зберігання розчинів препаратів МК на протязі п'яти років веде до 2–3-разового зниження їхньої індукційної активності порівняно зі свіжорозчиненими препаратами. Зберігання готового розчину МК протягом трьох років не приводить до достовірного зниження його інтерфероніндукуючої здатності ($p > 0,05$). Судячи з отриманих даних, термін придатності розчинів МК за указаних умов зберігання становить 3 роки з моменту виготовлення, після чого спостерігається достовірне падіння їхньої індукційної активності ($p < 0,05$). Вірогідну причину поступового зменшення індукторної здатності МК можна віднести на рахунок можливої структурної деградації і, таким чином, втрати відповідних біологічних активностей РНК у розчині [6; 7]. Імовірно, що дотримання стандартно прийнятих умов зберігання розчинів полінуклеотидних препаратів (зберігання у рефрижераторі при температурі -20°C) зумовило б дещо віддаленішу в часі втрату їхньої активності. Оскільки компоненти МК поставляються виробниками в сухому вигляді, для використання МК у промислових умовах можна як готувати розчини індуктора безпосередньо перед застосуванням і в об'ємах, розрахованих на конкретні технологічні ємності для культивування клітин-продуцентів, так

і використовувати готовий розчин, що зберігався не більше трьох років з часу виготовлення.

Висновки. За дослідженими параметрами МК позбавлений суттєвих недоліків, які могли б стати на перешкоді його використанню у промислових умовах. Ураховуючи відносно невелику ціну компонентів МК, цей комплекс можна розглядати як перспективний інтерфероген при широкомасштабному отриманні препаратів α/β -ІФН природного походження. Використання МК може зняти такі проблеми, що мають місце при виробництві α/β -ІФН, як інактивація та очистка від вірусів-індукторів, або ж значні витрати, пов'язані з використанням стандартних розчинних індукторів полінуклеотидної природи.

1. Ершов Ф.И., Новохатский А.С. Интерферон и его индукторы. – М., 1980.
2. Жолобак Н.М., Карпов А.В., Рыбалко С.Л. та ін. // Антибиотики и химиотерапия. – 1999. – Т. 44, № 4. – С. 21–24.
3. Иммунологические методы исследований / Под ред. И. Лефковитса и Б. Пернуса. – М., 1988. – С. 232–240.
4. Карпов А.В., Жолобак Н.М. // Антибиотики и химиотерапия. – 1995. – Т. 40, № 5. – С. 20–23.
5. Культуры животных клеток / Под ред. Д. Фрешни. – М., 1989.
6. Методы исследования нуклеиновых кислот / Под ред. А.Н. Белозерского. – М., 1970.
7. Садыков А.С., Ершов Ф.И., Новохатский А.С. и др. Индукторы интерферона. – Ташкент, 1978

Надійшла до редколегії 17.10.05