

УДК 578.245.577.113.7

©1996

О.В. Карпов, Н.М. Жолобах

## ІНТЕРФЕРОНОГЕННІ ВЛАСТИВОСТІ КОМПЛЕКСІВ ДРІЖДЖОВА РНК — ТИЛОРОН

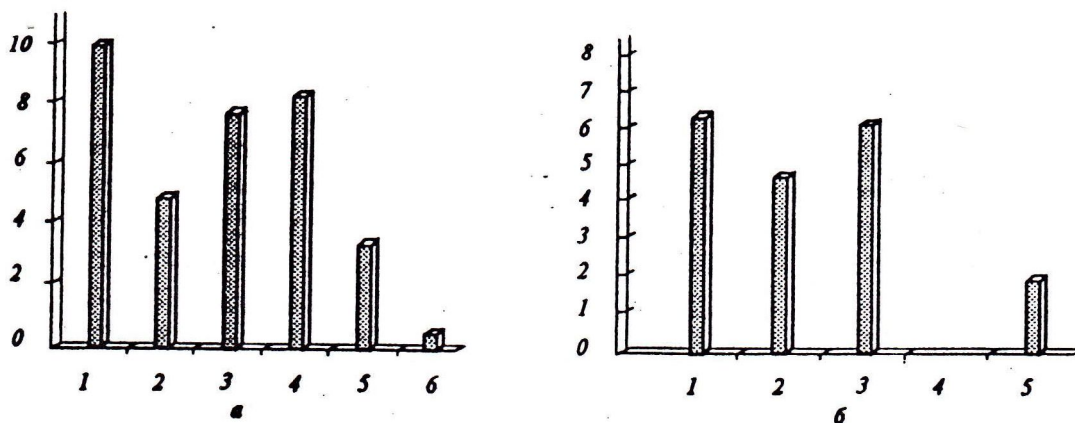
(Представлено членом-кореспондентом НАН України І.Г. Скрипалем)

*The interferonogenic activity of yeast RNA — tilorone molecular complexes was shown in vivo and in vitro studies. At experimental doses ranges the complexes were not toxic. It was proposed that in a base of the revealing inducer effect of the complexes, the formation lies of long double-helical sites of RNA that are stabilized by tilorone molecules intercalated between base pairs.*

Накопичена за останні роки інформація в питанні індукції інтерферонів (ІФН) за допомогою природних та синтетичних речовин-індукторів дозволяє розглядати їх поряд з самими ІФН, як найбільш універсальні та перспективні засоби боротьби з вірусними інфекціями. До того ж в умовах *in vitro* згадані індуктори використовуються для широкомасштабного виробництва препаратів ІФН різноманітними культурами клітин.

Коло відомих на даний час індукторів ІФН, зокрема ІФН 1 типу ( $\alpha/\beta$ -ІФН), дуже широке, але лише кілька з них вважаються клінічно перспективними [1]. До таких, в першу чергу, відносять штучні та природні двоспиральні полірибонуклеотиди, а також, в деякій мірі, невелику кількість синтетичних низькомолекулярних сполук, зокрема, 2,7-біс-[2-(діетиламіно-етокси)-флуорен]-9-он дигідрохлорид (тилорон) [2,3]. В свою чергу, вибір індукторів для виробництва препаратів ІФН ускладнюється додатковими специфічними вимогами технології. Тому, поряд з пошуком нових високоактивних інтерферогенів серед різноманітних класів біологічно активних речовин, перспективним вважається конструювання індукторів на базі можливих комбінацій речовин з відомим індукторним ефектом. Нижче наводяться дані про індукторну дію сумішей дріжджової РНК з тилороном та деякі фізіологічні параметри цього ефекту в дослідях *in vivo* та *in vitro*.

Раніше було встановлено, що тилорон у розчинах взаємодіє як з ДНК, так і з РНК з утворенням відносно стабільних молекулярних комплексів (МК) [4,5]. Ми проводили досліді з МК, які готували прямим змішуванням вихідних розчинів компонентів у концен-



Індукція інтерферону *in vivo* (а) та *in vitro* (б) під дією МК. а: 1 — МК (1,46 мг/кг); 2 — ларифан (1,33 мг/кг); 3 — poly(I)-poly(C) (0,66 мг/кг); 4 — тилорон (50 мг/кг; рекомендована доза); 5 — тилорон\* (1,33 мг/кг); 6 — РНК\* (1,33 мг/кг); б: 1 — МК (25 мкг/10<sup>6</sup> клітин); 2 — ларифан (50 мкг/10<sup>6</sup> клітин); 3 — poly(I)-poly(C) (50 мкг/10<sup>6</sup> клітин); 4 — тилорон\* (2,2 мкг/10<sup>6</sup> клітин); 5 — РНК\* (22,3 мкг/10<sup>6</sup> клітин). РНК\* — Доза, що відповідає вмісту речовини в МК

ок, відповідних окремим дослідом. Як компоненти МК використовували дріжджову комерційний препарат виробництва "Біохімреактив", Латвія), яку додатково очищали шляхом потрібної фенольної депротеїнізації з наступним осадженням етанолом за стандартною методикою, та тилорон ("Sigma", США). Розчинником був буферний розчин, що містив 0,01 моль трис-НСІ (рН 6,8) і 0,05 моль NaCl.

стандартні інтерферогени використовувались poly (I) – poly (C) ("Calbiochem", США) та ларифан (лікарська форма препарату двоспіральної РНК бактеріофага f<sub>2</sub>, Інститут мікробіології ім. А. Кірхенштейна, Латвія).

досліди по визначенню інтерферогенної дії МК *in vivo* проводили на білих безпорошкових мишах масою 18–20 г. Контрольною групою були тварини, яким вводили буферний розчин.

Інтерферогенну дію МК *in vitro* вивчали в клітинах мишей культуральної лінії L 929, які вирощували згідно з стандартною методикою.

Визначення ІФН в сироватках крові мишей та культуральному середовищі клітин здійснювали в гомологічній культурі, використовуючи як тест-вірус вірус везикулярного герпесу (штам Індіана) в дозі 100 ТЦД<sub>50</sub>.

Рівняльні дослідження інтерферогенної активності МК в організмі піддослідних мишей та в культурі клітин показали (рис. 1), що такі комплекси здатні індукувати інтерферон в обох системах на рівні титрів відомих індукторів. Відзначимо, що дози МК, які використовували в обох серіях дослідів (відносно їх нуклеїнового компоненту), практично відповідали дозам індукторів рибонуклеїнової природи, в яких, згідно з літературними даними, останні виявляють оптимальну дію [1]. При цьому дріжджова РНК сама по собі не викликала інтерферонної дії була позбавлена, що збігається з даними [6].

Важливе нами явище ще більш цікаве з огляду на те, що другий компонент МК — тилорон, який випробували в дозі, рівній його вмісту в складі МК, мав дуже слабку інтерферогенну дію *in vivo* та зовсім позбавлений її *in vitro*. Відомо, що тилорон індукуює інтерферон тільки в організмі і до того ж у дозах, що перевищують його вміст в МК в 10 разів, справляючи при цьому певний токсичний ефект [1,3]. Нами встановлено, що дози МК у всіх використаних дозах нетоксичні. Так, в інтервалі доз 5–100 мкг/мл не спостерігали цитодеструктивних змін клітин у культурі при контакті з МК до 24 год.

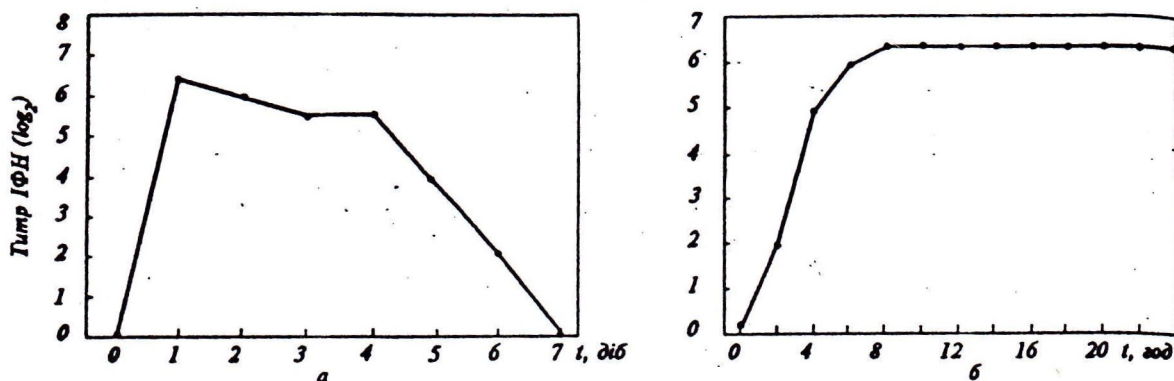


Рис. 2. Динаміка накопичення інтерферону in vivo (а) та in vitro (б) під дією МК

В умовах in vivo не відзначалось загибелі тварин протягом усього часу спостереження (14 діб). Миші нормально розвивалися, набирали масу. Ніяких розбіжностей у середніх масах органів піддослідних і контрольних тварин не виявлено.

Про значну і пролонговану дію МК на рівні відомих індукторів свідчить виявлена динаміка накопичення ІФН у сироватках крові мишей та культуральній рідині клітин L 929 (рис. 2).

З метою вибору оптимальних умов використання МК in vivo та in vitro вивчали вплив співвідношення компонентів та доз, що вводилися, на інтерферогенез. Виявилось, що максимальну індукторну дію в обох системах мали МК, в яких молярне співвідношення тилорону до фосфату РНК становило 1/10.

Доза 5 мг/кг маси тварин виявилася оптимальною для одержання найбільшого рівня сироваткового ІФН. Ця доза, відносно нуклеїнового компонента МК, була в 10 разів меншою, ніж оптимальна доза стандартного рибонуклеїнового індуктора — ларифану [1,2]. Оптимальним способом введення МК тваринам виявився внутрішньом'язовий.

В умовах in vitro оптимальна індукційна доза МК становила 25 мг/10<sup>6</sup> клітин. Вказана величина практично збігається з дозами рибонуклеїнових індукторів, що використовуються при біосинтезі ІФН культурами клітин [1,2].

З метою визначення, до якого типу належить ІФН, що індукується за допомогою МК препарати сироватки крові мишей та культуральну рідину клітин L 929 після індукції піддавали інкубації при 60° С протягом 30 хв, а також підкислювали до рН 2,0 протягом 24 год, після чого знову визначали титри ІФН. Виявилось, що величини титрів ІФН після вказаних обробок практично не змінювалися. Це дало підставу віднести індукований ІФН до ІФН 1 типу ( $\alpha/\beta$ -ІФН).

Таким чином, у дослідях in vivo та in vitro виявлена інтерферогенна здатність МК що утворюються при зв'язуванні дріжджової РНК з тилороном. Відомо, що така здатність індукторів рибонуклеїнової природи залежить, насамперед, від наявності у їх вторинній структурі достатньої кількості відносно великих стабільних двоспіральних ділянок. Щодо комерційних препаратів дріжджової РНК, використаних у наших дослідях, то вони складаються переважно з фракцій рибосомальної РНК, в яких згаданих ділянок недостатньо для ефективного інтерферогенезу [6]. Механізм виявленого феномену може полягати в тому, що при комплексоутворенні РНК з тилороном відбувається стабілізація спонтанно виникаючих у розчині частково комплементарних двоспіральних фрагментів РНК. Відомо, що молекули при зв'язуванні з ДНК інтеркалюють між парами основ [4].

Встановлено також, що комплекси нуклеїнових кислот з молекулами-інтеркаляторами, зокрема тилороном, мають підвищену стабільність [4,5]. Саме такі стабільні двоспиральні ділянки комплексів РНК — тилорон, на наш погляд, діють у наведених вище умовах як інтерфероген.

Отже, можна зробити висновок, що МК дріжджової РНК з тилороном є перспективними індукторами ІФН 1 типу, а детальне вивчення властивостей цього нового типу індукторів видається цікавим напрямком для подальшої роботи.

1. Садыков А.С., Ершов Ф.И., Новозатский А.С. и др. Индукторы интерферона. — Ташкент: Фан, 1978. — 303 с.
2. Torrence P.T., De Clercq E. Interferon induction by nucleic acids: structure — activity relationships // *Interferon and their applications* /Ed. P.E. Came, W.A. Carter. — Berlin, etc.: Springer-Verlag, 1984. — P. 233–258.
3. Stringfellow D.A. Nonpolynucleotide inducers of interferon // *Ibid.* — P. 371–383.
4. Chandra P., Zunino F., Gaur V.P. et al. Mode of tilorone hydrochloride interaction to DNA polydeoxyribonucleotides // *FEBS Lett.* — 1972. — 28, N 1. — P. 5–9.
5. Chandra P., Zunino F., Zaccara A. et al. Influence of tilorone hydrochloride on the secondary structure and template activity of DNA // *Ibid.* — 23, N 2. — P. 145–148.
6. Головин Б.П., Аксенов О.А. Природные и синтетические полимеры — индукторы интерферона /Обзор литературных данных // *Вопросы вирусологии и патогенеза респираторных вирусных инфекций: Сб. науч. работ.* — Л., 1970. — С. 119–128.