



УДК 578.245:577.1113.7:57.086.833

© 2003

О. В. Карпов, С. В. Верьовка, О. П. Манджос, Ю. М. Пенчук,
В. М. Поводзинський, Н. М. Жолобак, М. Я. Співак,
О. К. Кисельова

Індукція інтерферонів І типу в умовах *in vitro* за допомогою іммобілізованого комплексного інтерфероногену

(Представлено членом-кореспондентом НАН України В. С. Підгорським)

In vitro experiments, we have shown the interferonogenic activity of molecular constructions consisting of single-stranded yeast RNA covalently bound to an insoluble carrier and tilbrone. The results obtained confirm the presumption concerning the induction mechanism of interferons of type I including, at its first stage, the contact a double-stranded ribopolynucleotide with a cell membrane without penetration into the cell. These constructions seem to be promising for the large-scale interferon production.

У зв'язку з широким застосуванням у сучасній лікарській практиці препаратів інтерферонів (ІФН) досить актуальним є пошук та створення індукторів їх синтезу, які відповідали б максимуму вимог сучасного фармацевтичного виробництва, у першу чергу таких, як дешевизна та спрощена технологія застосування. Індуктори ІФН І типу ($\alpha/3$ -ІФН), що використовуються зараз — деякі віруси, а також природні та синтетичні дволанцюгові РНК (длРНК), — не повністю відповідають цим вимогам; препарати длРНК досить дорогі у використанні, а застосування вірусів як індукторів потребує додаткових трудомістких етапів очистки ІФН.

Раніше було показано, що молекулярний комплекс, який утворюється при взаємодії одностанцюгової дріжджової РНК з тилороном (МК), здатний індукувати $\alpha/3$ -ІФН в організмі та культурах клітин на рівні інтерфероногенів полінуклеотидної природи [1, 2]. З іншого боку, існують дані щодо застосування препаратів синтетичних длРНК, іммобілізованих на нерозчинних матрицях, як індукторів ІФН в умовах *in vitro* [3, 4].

Метою даної роботи було створення препаратів МК, іммобілізованих на нерозчинних матрицях (ІММК), і випробування таких молекулярних конструкцій як інтерфероногенів. Для цього комерційний препарат дріжджової РНК (рибосомальна фракція) (НПО «Біохіміреактив», Латвія) ковалентно пришивали до гранул сферону (Spheron 300 (LC) Lachema,

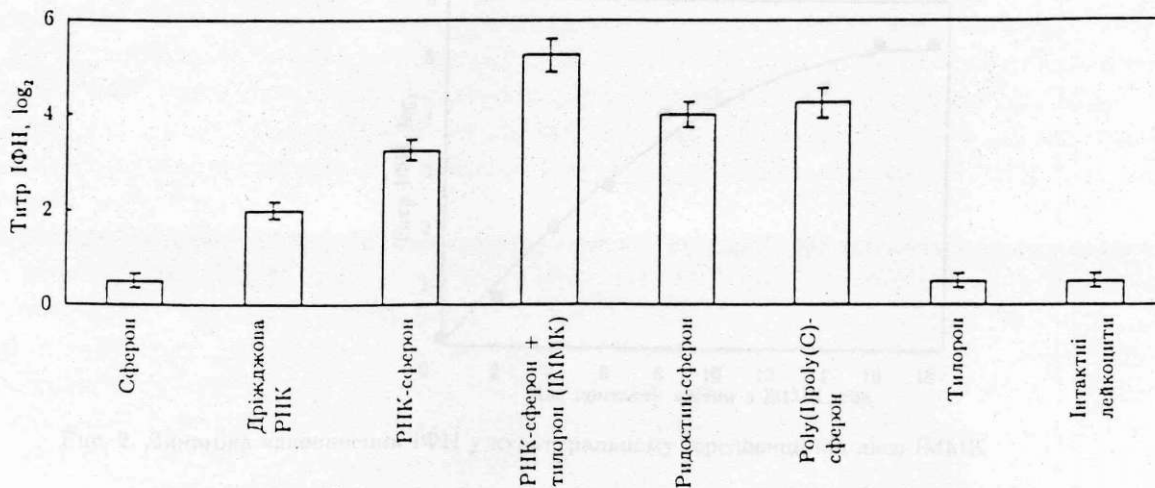


Рис. 1. Інтерфероніндукуюча дія ІММК та його компонентів

Чехія) ціаибромідним методом [5]. Остаточний вміст РНК на носії визначали як балансовим розрахунком, так і за допомогою кольорової реакції з орциновим реактивом [6]. В отриманих препаратах він становив $30 \pm 2,8$ мкг РНК/мл носія. Такі препарати дали інкубували в 0,05 М розчині гідрохлориду тилорону («Sigma», США) у буфері, що містив 0,01 М *трис*-HCl (рН 6,8) протягом 1 год, після чого отриманий ІММК відділяли від розчину фільтрацією на нутчфільтрі. Аналогічно, з використанням того ж носія, готували препарати порівняння — іммобілізовані стандартні індуктори ІФН I типу нуклеїнової природи — ридостин (длРНК дріжджів *S. cerevisiae*, НПО «Вектор», Росія) та poly(I)-poly(C) («Serva», Німеччина).

Визначення інтерферогенних властивостей усіх досліджуваних препаратів інтерферогенів проводили на первинній культурі мононуклеарних клітин людини, які виділяли з периферійної крові I (0) групи в градієнті фікол - урографін ($p = 1,077$) згідно зі стандартною методикою [7]. Культивування клітин здійснювали у відповідності із загальноприйнятим методом [8], використовуючи поживне середовище 199 (НВП «Біо-Тест-Лабораторія», Україна) з додаванням 5-10% ембріональної сироватки телят («Serva»), 25 мМ/мл 4-(2-гідроксіетпл)-1-піперазиностансульфонової кислоти (HEPES) («Serva»), 10 мМ/мл L-глутаміну та антибіотиків — пеніциліну та стрептоміцину або канаміцину в загальноприйнятих дозах при 37 °С і 5% вмісті двоокису вуглецю в газовій фазі. Клітини культивували в 24-лункових пластикових планшетах «Falcon» (США). Для визначення інтерферогенної дії ІММК та іммобілізованих стандартних індукторів їх концентровані завпей додавали до суспензії клітин зі щільністю $1 \cdot 10^6$ клітин/1 мл середовища. Титрування ІФН у зразках проводили за стандартною методикою [9], використовуючи тест-вірус — вірус везикулярного стоматиту, штам Індіана у дозі 100 ТДЦ₅₀.

Результати оцінки інтерферогенної здатності ІММК у порівнянні з іншими препаратами наведені на рис. 1. У той час як обробка мононуклеарних клітин сфероном тилороном, що бралися окремо, не призводила до появи ІФН в культуральному середовищі, ІММК, на відміну від вказаних його компонентів, викликав у культурі клітин досить значну індукцію синтезу ІФН. При цьому інтерферогенна дія ІММК перевищувала дію стандартних рибополінуклеотидних індукторів — препаратів длРНК — ридостину та poly(I)-poly(C), іммобілізованих на тому ж носії в аналогічних умовах. Звертає на себе увагу і те, що

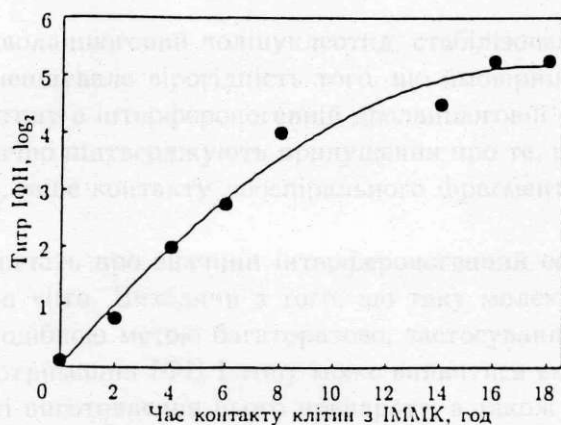


Рис. 2. Динаміка накопичення ІФН у культуральному середовищі під дією ІММК

досить велика інтерферопогенність була притаманна іммобілізованому препарату одноланцюгової дріжджової РНК у порівнянні з її неіммобілізованою формою. Оскільки, як відомо, індукторний ефект здатні здійснювати лише дволанцюгові рибополінуклеотиди (або їх дволанцюгові фрагменти) [9], вказаний факт можна пояснити утворенням досить значної кількості дволанцюгових структур у складі одноланцюгової дріжджової РНК у процесі її іммобілізації на сферон, напевне, внаслідок просторового зближення окремих одноланцюгових ділянок полімеру. При комплексоутворенні ж нуклеїнового компонента такої іммобілізованої конструкції з гідрохлоридом тилорону (препарат ІММК) індукційний ефект ще більше підвищувався, що свідчить про здійснення раніше встановленого явища утворення в складі іммобілізованої РНК додаткових дволанцюгових фрагментів з частковою комплементарністю, стабілізованих інтеркальованими молекулами тилорону і здатних внаслідок цього забезпечувати вказаний інтерферопогенний ефект [1, 2].

Найвищого рівня продукція ІФН мононуклеарними клітинами крові людини в умовах їх стимулювання ІММК досягає приблизно на 15 годину після початку дії цього індуктора (рис. 2), що значно перевищує відповідний час у випадку застосування неіммобілізованого комплексу дріжджової РНК — тилорон (8 год) [1]. Така затримка може бути пов'язана як з неоднотимчасним контактом окремих клітин з частками ІММК в суспензії при перемішуванні, так і з різними механізмами індукції ІФН, задіяними в цих випадках.

Головним аспектом питання щодо інтерферопогенної дії ІММК є самий факт її наявності. Те, що іммобілізований молекулярний комплекс дріжджової РНК, у складі якої знаходяться дволанцюгові ділянки, стабілізовані інтеркалятором (тилоропом), здатний викликати індукцію ІФН, підтверджує припущення про те, що для створення сигналу до індукції нуклеїнової кислоти не обов'язково потрапляти всередину клітини. Ця можливість перевірялася в досліджах, де вивчався індукторний ефект длРНК, іммобілізованих на сефадексах та нітроцелюлозних плівках [3, 4]. Однак результати цих дослідів, що свідчать загалом про індукційний ефект, притаманний даним конструкціям, все ж не дали однозначної відповіді щодо шляху утворення індукційного сигналу, оскільки теоретично вільні фрагменти длРНК, відщеплені від іммобілізованої на вказаних носіях длРНК нуклеазам, що містилися в клітинному записі, могли потрапляти всередину клітин, викликаючи індукцію ІФН у такий спосіб. У нашому випадку, якщо таке відщеплення і відбувалося, відщеплений фрагмент не міг залишатися дволанцюговим достатньо довго внаслідок дифузії стабілізуючих його молекул тилорону. При цьому, як відомо, така дифузія відбувається тим

швидше, чим коротшим є дволанцюговий поліуклеотид, стабілізований інтеркалятором. Це, в свою чергу, значно зменшувало вірогідність того, що ймовірний відщеплений фрагмент РНК потрапить у клітину в інтерферогенній дволанцюговій формі. Таким чином наші досліди досить однозначно підтверджують припущення про те, що для запуску індукційного сигналу достатньо лише контакту двоспірального фрагмента РНК з клітинною мембраною [10].

Одержані результати свідчать про значний інтерферогенний ефект, який здійснює препарат ІММК в умовах *in vitro*. Виходячи з того, що таку молекулярну конструкцію можна використовувати з подібною метою багаторазово, застосування препаратів ІММК в промислових умовах для отримання ІФН I типу може виявитися економічно доцільним внаслідок невеликої вартості виготовлення цього препарату, а також у зв'язку з тим, що при такій технології відпадають складні та трудомісткі етапи очищення ІФН від вірусу, який використовується зараз як індуктор.

1. Карпов А. В., Жолобак Н.М. Изучение штерфероогешієх свойств комплексов дрожжевая РНК - тилорон в культуре клеток // Антибиотики и химиотерапия. - 1995. - 40, № 5. - С. 20-23.
2. Карпов А. В., Жолобак Н. М. Продукция интерферонов I типа в организме под действием молекулярных комплексов дрожжевая РНК - тилорон // Вопр. вирусологии. - 1996. - № 1. - С. 13-16.
3. Taylor-Papadimitriou J., Kalias J. Induction of interferon by "sepharose" — bound poly(I)-poly(C) // Nature New Biol. - 1973. - 245. - P. 143-144.
4. Pitha P. A/, Pitha J. Interferon induction site: poly IC on solid substrate carriers // J. Gen. Virol. - 1973. - 21, No 1. - P. 31-37.
5. March S. C., Parikh /., Cuatrecasas P. A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography // Anal. Biochem. - 1974. - 60. - P. 149-152.
6. Методы исследования нуклеиновых кислот / Под ред. А. Н. Белозерского. - Москва: Мир, 1970. - 277 с.
7. Иммунологические методы исследований / Под ред. И. Лефковитса и Б. Перниса. - Москва: Мир, 1988. - С. 232-240.
8. Культуры животных клеток / Под ред. Д. Фреша. - Москва: Мир, 1989. - 332 с.
9. Ершов Ф. И., Новохатский А. С. Интерферон и его индукторы. - Москва: Медицина, 1980. - 240 с.
10. Карпов А. В. A possible general mechanism of the signal transfer switching on the $\alpha/3$ -interferons expression. I. The local cell membrane deformation as the first induction stage // Биополимеры и клетка. - 1998. - 14, No 6. - С. 1-6.

*Институт мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ
Институт біохімії ім. О. В. Палад'я
НАН України, Київ
Національний університет харчових технологій, Київ*

Надійшло до редакції 13.01.2003