

Винахід відноситься до галузі імунології та може бути використаний у медицині, ветеринарії та загальній біології.

Коло індукторів інтерферонів I типу (α/β -інтерферони) на даний час дуже широке. Воно включає в себе віруси, що містять у своєму складі РНК, рибонуклеїнові кислоти, як із різних природних джерел, так і синтетичні, в також ряд синтетичних полікатіонів і низькомолекулярних сполук, застосування яких можна розглядати як аналоги даного винаходу. Однак, не дивлячись на це, ні один із відомих інтерферогенів в повному обсязі не відповідає усім критеріям, що висуваються до них у практиці охорони здоров'я та ветеринарії. Так і природні, і синтетичні рибополінуклеотиди проявляють індукторні властивості тільки в тому разі, якщо містять у своїй структурі великі двоспіральні ділянки. Тому в якості індукторів використовуються або препарати вірусних (фагових) двоспіральних РНК, або синтетичні двоспіральні олігонуклеотиди (здебільшого - **poly(I)-poly(C)**). Однак вказані індуктори мають ряд недоліків, серед яких можна виділити короткочасність інтерферогенного ефекту після введення та значні матеріальні витрати при їх отриманні. Другий поширений тип індукторів інтерферонів I типу - синтетичні низькомолекулярні сполуки і, зокрема, їх найбільш відомий представник - 2,7-біс-[2-(діетіламіноетоксі)-флуорен]-9-он дігідрохлорид (тилорон), окрім притаманної йому інтерферогенної здатності, характеризується також значною токсичністю в дозах, що викликають інтерферогенний ефект. Способи індукції інтерферонів в організмі за допомогою обох типів вказаних вище сполук в разі, коли їх застосовують самих по собі, були прототипами цього винаходу.

Задача винаходу - направлене конструювання принципово нового індуктору інтерферонів I типу (α/β -інтерферон), що має, поряд з підвищеною та пролонгованою інтерферогенною дією, такі додаткові переваги у відношенні до відомих інтерферогенів, як простота, технологічність та невелика вартість виготовлення. Поставлена мета досягалася таким чином:

Для виготовлення молекулярних комплексів (МК) використовували комерційний препарат дріжджової РНК виробництва НПО "Біохімреактив", м.Олайна, Латвія, який додатково очищали потрібною фенольною депротейнізацією з подальшим осадженням етанолом згідно стандартної методики (3) МК готували прямим змішуванням розчинів дріжджової РНК (0,1мг/мл) в буферному розчині, що містить у своєму складі 0,01М трис-НСІ (рН 6,8) і 0,05М NaCl з розчином тилорону ("Sigma", США) заданої концентрації у тому ж буфері.

Комерційні препарати дріжджової РНК складаються здебільшого з фракцій рибосомальної та транспортної РНК. Вказані фракції, як відомо, практично не містять у своїй структурі великих стабільних двоспіральних ланок 5, як наслідок, є дуже слабкими індукторами інтерферону (4). Попередні фізико-хімічні дослідження, проведені нами, показали, що при утворенні комплексів дріжджової РНК з тилорonom відбувається значна стабілізація двоспіральних олігорибонуклеотидних структур.

З метою встановлення і характеристики інтерферогенних властивостей МК в організмі експериментальних тварин був поставлений ряд дослідів.

Досліди провадили на білих безпородних мишах масою 15г. Тварини, яким вводили чистий буферний розчин, були контрольною групою (плацебо).

Як стандартні індуктори порівняння використовувались лафарин (лікарняна форма препарату дсРНК бактеріофагу f2, Інститут мікробіології ім. Августа Кірхенштейна, Латвія) та **poly(I)-poly(C) ("Calbiochem", США)**, які вводили експериментальним тваринам у вигляді розчинів у згаданому вище буфері в концентраціях і дозах, що забезпечували, згідно літературних даних, максимальний індукторний ефект.

Титування інтерферону у сироватках крові експериментальних тварин проводили згідно стандартної методики, використовуючи як тест-вірус вірус везикулярного стоматиту (BBC) штам Індіана в дозі **100 TC₅₀**.

Вирішення поставленої задачі пояснюється такими прикладами:

Приклад 1. Пряме порівняння інтерферогенної здатності МК проводили по відношенню як до компонентів комплексу, взятих окремо, так і до відомих стандартних індукторів. Результати зведені в табл.1.

Як видно із даних, що представлені в табл.1, МК здійснює найбільший вплив на інтерферогенез в організмі дослідних тварин, порівняно зі всіма випробуваними індукторами. Слід відмітити, що доза МК, яка вводилася (відносно її нуклеїнового компоненту), практично відповідала дозам індукторів рибонуклеїнової природи, в яких, згідно літературним даним, вони виражають оптимальну дію. При цьому сама по собі дріжджова РНК, яку вводили в згаданій дозі, інтерферогенної активності позбавлена. Другий компонент МК - тилорон, що використовувався сам по собі в дозі, відповідній його вмісту в МК, мав дуже слабку індукторну дію порівняно з такою в рекомендованій дозі, що переважала першу майже в 500 раз. Це не могло не вплинути на рівень токсичності препарату МК. В той час, як тилорон в рекомендованих для індукції інтерферону дозах справляє помітну токсичну дію, МК у всіх дозах, що використовувались тут і далі, виявилися повністю нешкідливими. Не відмічалось загибелі тварин на протязі всього часу спостереження (14 діб). Тварини нормально розвивалися, набирали вагу. Ніяких розбіжностей у середніх масах органів оброблених і контрольних тварин виявлено не було.

Приклад 2. Одноразове введення дослідним тваринам МК приводить до значного і пролонгованого накопичення інтерферону в сироватках крові цих тварин (фіг.1).

Як видно з даної фігури, максимум продукції інтерферону в крові мишей припадає на першу добу після введення МК, після чого досягнутий рівень підтримується практично 4 - 5 діб, повертаючись до вихідного тільки на 7 добу. Таким чином за динамічними параметрами препарати МК вигідно відрізняються від полірибонуклеїнових індукторів (максимум продукції інтерферону - 1 - 2 доби; час дії - 3 - 4 доби) і тилорону (2 - 3 доби і 3 - 4 доби відповідно) (1).

Приклад 3. З метою підбору оптимальних умов використання МК проводили вивчення впливу співвідношення компонентів МК, дози, що вводиться, а також засобу введення даного індуктору на продукцію інтерферону у сироватці крові експериментальних тварин. Результати цих дослідів представлені на фіг.2 і 3, а також в табл.2 відповідно.

Виходячи із даних, що представлені на фіг.2, 3 і табл.2 можна зробити висновок, що для досягнення максимального інтерфероногенного ефекту в організмі експериментальних тварин оптимальним співвідношенням компонентів МК для введення буде 1/10 (М/М тилорон/фосфат РНК), оптимальною дозою - 4мг МК (по РНК) на кг ваги тварин і оптимальним засобом введення цього індуктора - внутрішньом'язовий.

Приклад 4. З метою встановлення, до якої групи належить інтерферон, що індукується у відповідь на введення МК в сироватках крові мишей провели вивчення дії на вказані сироватки деяких фізичних факторів. Результати цих дослідів приведені в табл.3.

Із даних, що представлені в табл.3, видно, що титри інтерферону в сироватках під дією прогрівання при температурі 60°C і підкислення до рН 2,0, не міняються. Це свідчить, що інтерферон, який індукується при введенні МК, в силу кислото- та термостійкості належить до інтерферонів I типу (α/β -інтерферони) (2).

Таким чином, в результаті проведеної роботи розроблений принципово новий спосіб індукції інтерферонів I типу в організмі за допомогою індуктора, що являє з себе молекулярний комплекс дріжджової РНК та тилорону. Спосіб розроблений на прикладі α/β -інтерферонів мишей, але може бути адаптований для індукції α/β -інтерферонів в організмі людей, а також свійських тварин - свиней, ВРХ, коней та інших.

Т а б л и ц я 1

Титри Інтерферону в сироватці крові мишей після введення МК та стандартних Індукторів*

Індуктор, що вводився	Доза, мг/кг маси	Титри Інтерферону	Середній титр (log ₂)
Контроль (плацебо)	-	-	-
МК**	5,5	1:1280, 1280, 320	9,3
Лафарин	2,5	1:20, 32, 20	4,3
poly(I)-poly(C)	2,5	1:160, 320, 160	7,3
Тилорон ***	30,0	1:160, 640, 320	8,0
Тилорон ****	0,5	1:160, 160, 160	7,0
РНК дріжджова*****	5,0	-	-

* Введення Індукторів внутрішньочеревне; титри Інтерферону визначали через 24 години після введення Індуктора

** Співвідношення тилорон/РНК (фосфат) - 1/10

*** Доза відповідає рекомендованій для отримання Індукторного ефекту

**** Доза відповідає такій в складі МК

Таблиця 2

Залежність інтерферон-індукуючого ефекту МК від засобу введення*

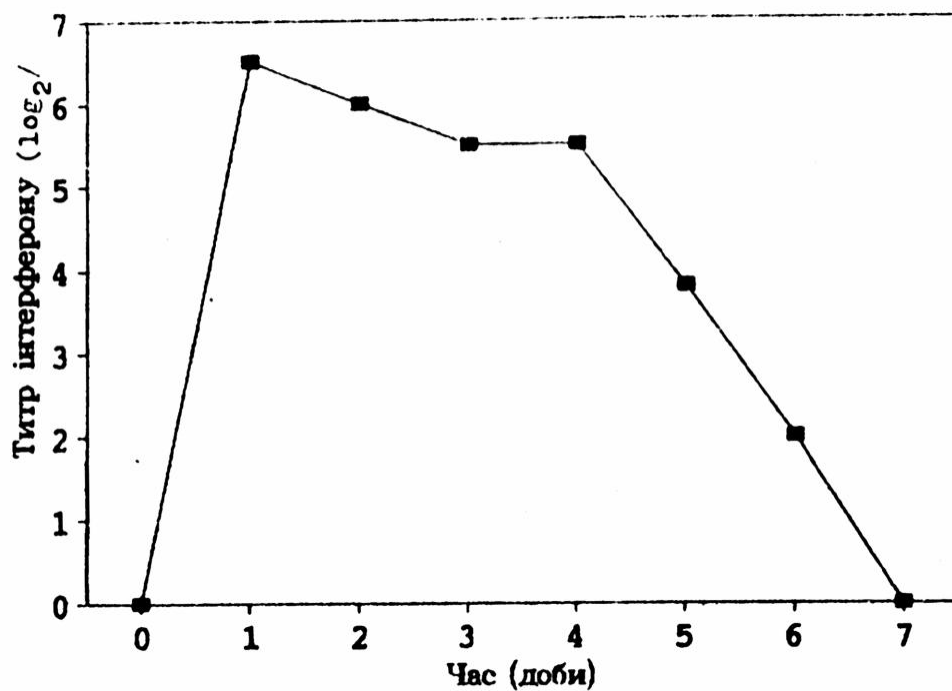
Засіб введення	Титри інтерферону	Середний титр (log ₂)
Внутрішньочеревно	1:1280, 1280, 320	9,8
Підшкірно	1:1280, 640, 640	9,7
Внутрішньом'язово	1:2560, 2560, 640	10,9
Внутрішньосудинно	1:640, 1280, 2560	10,5
Перорально	1:320, 670, 320	8,7

*Доза МК, що вводили, та співвідношення складових аналогічні вказаним в табл.1; титри інтерферону визначали через 24 години після введення.

Таблиця 3

Вплив фізичних факторів на титри інтерферону в сироватці крові мишей після введення МК

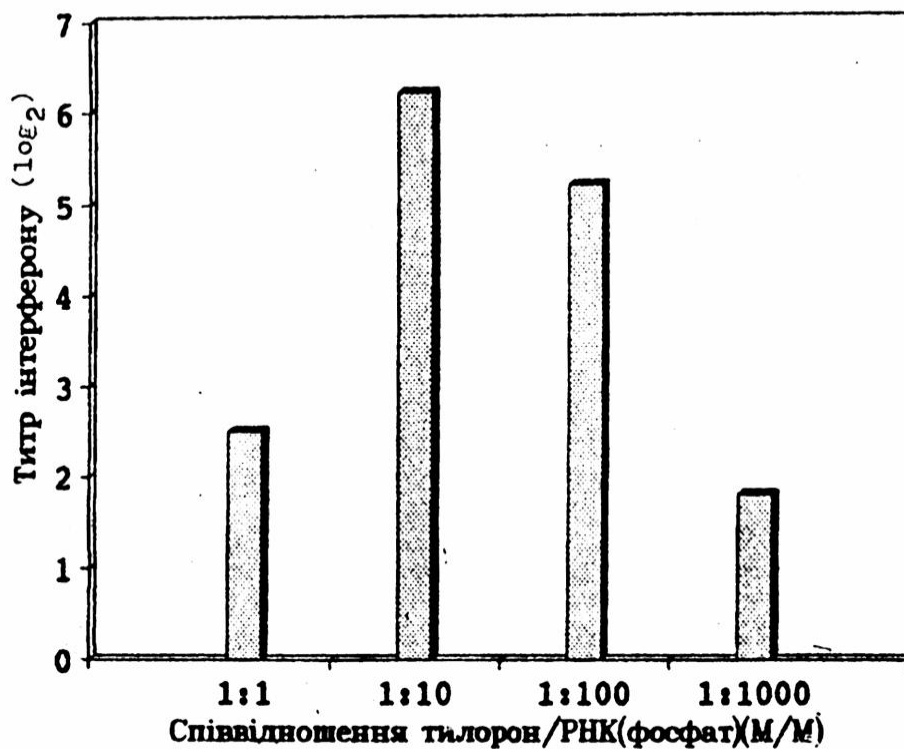
Умови обробки	Титри інтерферону					
	до обробки			після обробки		
	1	2	3	1	2	3
Температура 60°C, 30 хв	1280	1280	320	1280	1280	320
pH-7.0, 24 години	1280	1280	320	1280	1280	320



Фіг. 1

Динаміка накопичення Інтерферону в сироватці крові мишей після одноразового внутрішньочеревного введення МК*

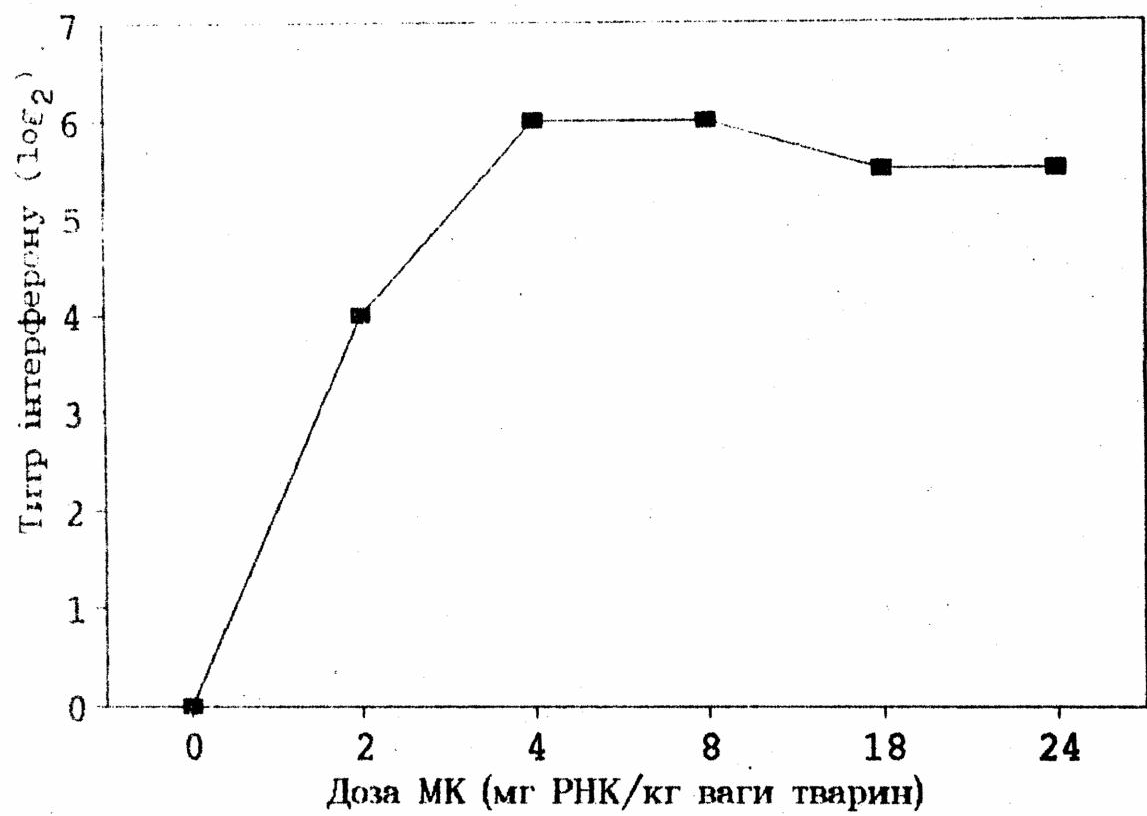
*Доза МК та співвідношення компонентів аналогічне вказаним у табл.1



Фіг. 2

Вміст Інтерферону в сироватці крові мишей після одноразового внутрішньочеревного введення МК* з різним співвідношенням компонентів

*Доза МК – 5,5 мг на кг маси тварин



Фіг. 3

Вплив дози МК на рівень Інтерферону в сироватках крові мишей*

*Співвідношення компонентів МК – 1/10 М/М (тилорон/фосфат РНК, введення внутрішньочеревно