

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

Кількість відомих на сьогоднішній час речовин, що мають властивості індукторів інтерферонів I типу (α/β -інтерферони), способи використання яких можна розглядати як аналоги даного винаходу, дуже велика. За їх допомогою інтерферони продукуються в системах *in vitro* різноманітними культурами клітин. Вони включають в себе, по-перше, віруси, що містять у своєму складі РНК, по-друге, рибонуклеїнові кислоти, як із різних природних джерел, так і синтетичні, і, нарешті, ряд синтетичних сполук - полікатіонів і низькомолекулярних гетероциклічних з'єднань. Однак незважаючи на велику різноманітність, ні один із відомих інтерферогенів згаданих типів в повному об'ємі не відповідає усім вимогам, що висуваються до них при широкомасштабному виробництві препаратів інтерферону. Так і природні, і синтетичні рибополінуклеотиди виявляють індукторну дію тільки в разі присутності у своїй структурі великих двоспінальних ділянок. Тому на практиці здебільшого використовуються або препарати вірусних (фагових) двоспінальних РНК, або синтетичні двоспінальні олігонуклеотиди (здебільшого - **poly(I)-poly(C)**). Вказані індуктори при застосуванні на виробництві мають ряд недоліків, серед яких можна виділити значні матеріальні витрати при їх отриманні та відносно невелику здатність до продукції інтерферону в культурах клітин. 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), в умовах *in vitro* індукторної дії позбавлений (2).

Задача винаходу - створення принципово нового індуктору інтерферонів I типу (α/β -інтерферон), який має при застосуванні в широкомасштабному виробництві препаратів інтерферону для потреб медицини та ветеринарії, поряд з підвищеною інтерферогенною дією, такі додаткові переваги по відношенню до відомих інтерферогенів, як простота, технологічність та невелика вартість виготовлення, а також відсутність потреби очистки отриманого матеріалу від вірусів та токсичних речовин. Прототипами запропонованого способу можна вважати використання окремо обох типів індукторів - рибонуклеїнового та синтетичного при їх окремому застосуванні. Поставлена мета досягалася таким чином:

Нуклеїновим компонентом молекулярних комплексів (МК) служив комерційний препарат дріжджової РНК виробництва НПО "Біохімреактив", м.Олайна, Латвія. Цей препарат додатково очищували потрійною фенольною депротейнізацією з подальшим осадженням етанолом згідно стандартної методики (3). МК готували прямим змішуванням розчинів дріжджової РНК (0,1 мг/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 в тому ж буфері.

Комерційні препарати дріжджової РНК складаються здебільшого з фракцій рибосомальної та транспортної РНК і тому практично не містять у своїй структурі великих стабільних двоспінальних ланок. Як наслідок, такі препарати є дуже слабкими індукторами інтерферону (4). Попередні фізико-хімічні дослідження, проведені нами, показали, що при утворенні комплексів дріжджової РНК з тилороном відбувається значна стабілізація двоспінальних олігорибонуклеотидних структур.

З метою встановлення і характеристики інтерферогенних властивостей МК в культурах клітин був поставлений ряд дослідів на перевивних клітинах мишей лінії **L929**, яку вирощували згідно стандартної методики.

Стандартними індукторами порівняння були лафарин (лікарняна форма препарату дсРНК бактеріофагу **f2**, Інститут мікробіології ім. Августа Кірхенштейна, Латвія) та **poly(I)-poly(C) ("Calblochem"**, США). Останні вносили в культуру у вигляді розчинів у згаданому вище буфері в концентраціях і дозах, що забезпечували, згідно літературним даним, максимальний індукторний ефект (1, 4).

Рівні екзогенного інтерферону визначали в культуральному середовищі через 24 год, після контакту клітин з індукторами інтерферону. Визначення інтерферону проводили культурі клітин **L929** на шлункових панелях за стандартною методикою, використовуючи як тест-вірус вірус везикулярного стоматиту (ВВС) штам Індіана в дозі **100 TCID₅₀**.

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.

Результати, представлені в табл.1 свідчать, що МК індукує найбільшу, порівняно з стандартними індукторами кількість інтерферону в культурі клітин L929. 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 (4). При цьому сама по собі дріжджова РНК, яку вносили до клітин в згаданій дозі, інтерферогенної активності була позбавлена. Другий компонент МК-тилорон, що використовувався сам по собі в дозі, відповідній його вмісту в МК, також був позбавлений індукторної дії, що відповідає

літературним даним (2). При контакті тилорону з культурою клітин його токсичність визначали після 24 годин інкубації за кількістю мертвих клітин, фарбуючи клітини 0,2% розчином трипанового синього. При цьому суттєвих відмінностей в кількості живих клітин та їх морфології в дослідних та контрольних культурах не відмічалось. Таким чином, кількість тилорону, відповідна його вмісту в комплексі, є цілком нетоксичною для клітин у культурі.

Приклад 2. При разовому внесенні в культуру клітин **L929** МК відбувається значне і пролонговане накопичення екзогенного Інтерферону в поживному середовищі (фіг.1).

Як видно з даної фігури, максимальна кількість інтерферону з'являється в середовищі на шосту годину після внесення МК. Далі титри інтерферону не зростають, залишаючись практично без змін до 24 години (строк спостереження). Таким чином, за динамічними параметрами дія препаратів МК в культурі клітин повністю співпадає з дією полірибонуклеїнових індукторів (максимум продукції інтерферону - 5 - 6 годин) (1, 4).

Приклад 3. З метою підбору оптимальних умов використання МК проводили вивчення впливу співвідношення компонентів МК, а також дози, що вводиться, на продукцію інтерферону культурою клітин. Дані цих дослідів представлені на фіг.2 і 3 відповідно.

Виходячи із результатів, що представлені на фіг.2 та 3 можна зробити висновок, що для досягнення максимального інтерферогенного ефекту в культурі клітин **L929** оптимальним співвідношенням компонентів МК для внесення буде 1/10 (ММ тилорон/фосфат РНК) і оптимальною дозою - 25мкг МК (по РНК) на 10^6 клітин.

Приклад 4. З метою встановлення, до якої групи належить отриманий інтерферон, провели вивчення дії на вказані препарати деяких фізичних факторів. Результати цих дослідів наведені на фіг.4.

Як видно із фіг.4, активність інтерферону під дією прогрівання при температурі 60°C на протязі 30 хвилин 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) (4).

Таким чином, в результаті проведеної роботи розроблений принципово новий спосіб індукції інтерферонів I типу в культурі клітин за допомогою індуктора, що являє з себе молекулярний комплекс дріжджової РНК та тилорону. Спосіб розроблений з використанням культури клітин мишей 929, але може бути адаптований для індукції α/β - інтерферонів культурами клітин людей, а також свійських тварин.

Таблиця

Продукція Інтерферону культурою клітин L929 під дією МК та стандартних Індукторів*

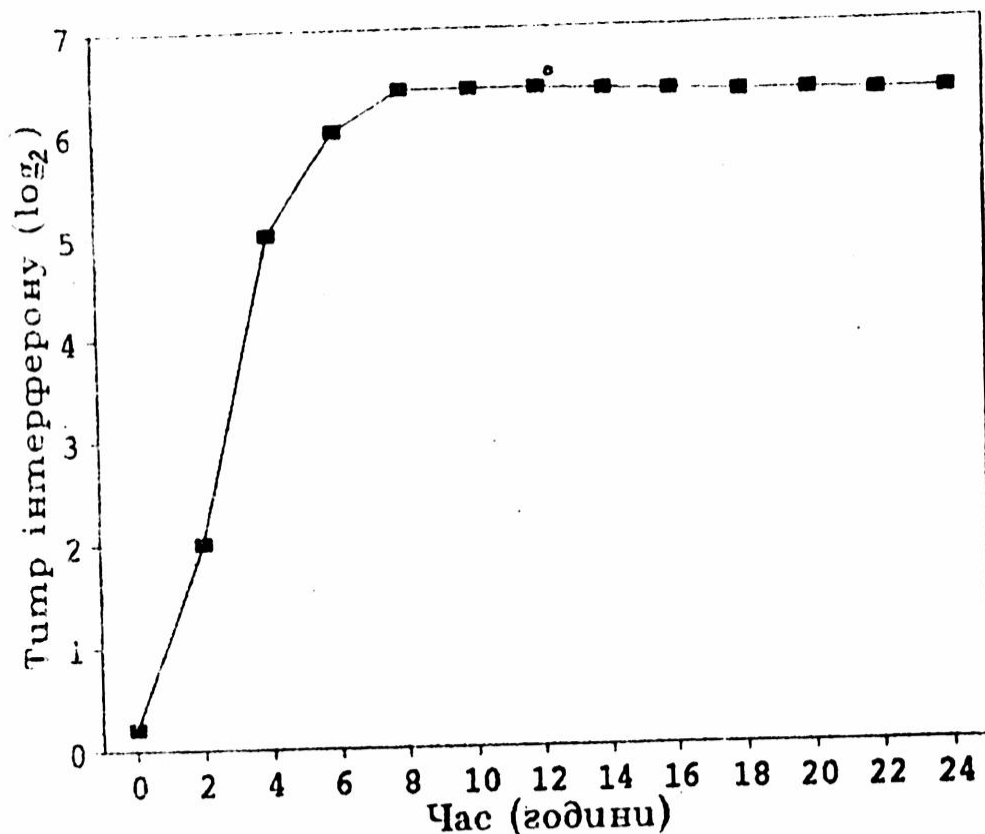
Індуктор, що вводився	Доза, мкг/10 ⁶ кл	Титри Інтерферону	Середній титр (log2)
Контроль	-	-	-
МК**	25.0	1:128; 64; 128	6,4
Лафарин***	50.0	1:32; 32; 16	4,8
poly(I)-poly(C)***	50.0	1:64; 128; 32	6,2
Тилорон ****	2.2	-	-
РНК дріжджова****	22.2	1:4; 4; 4	2,0

*Титри Інтерферону визначали через 24 години після внесення Індуктора;

**Співвідношення тилорон/РНК (фосфат) – 1/10;

***Доза відповідає рекомендованій для отримання Індукторного ефекту;

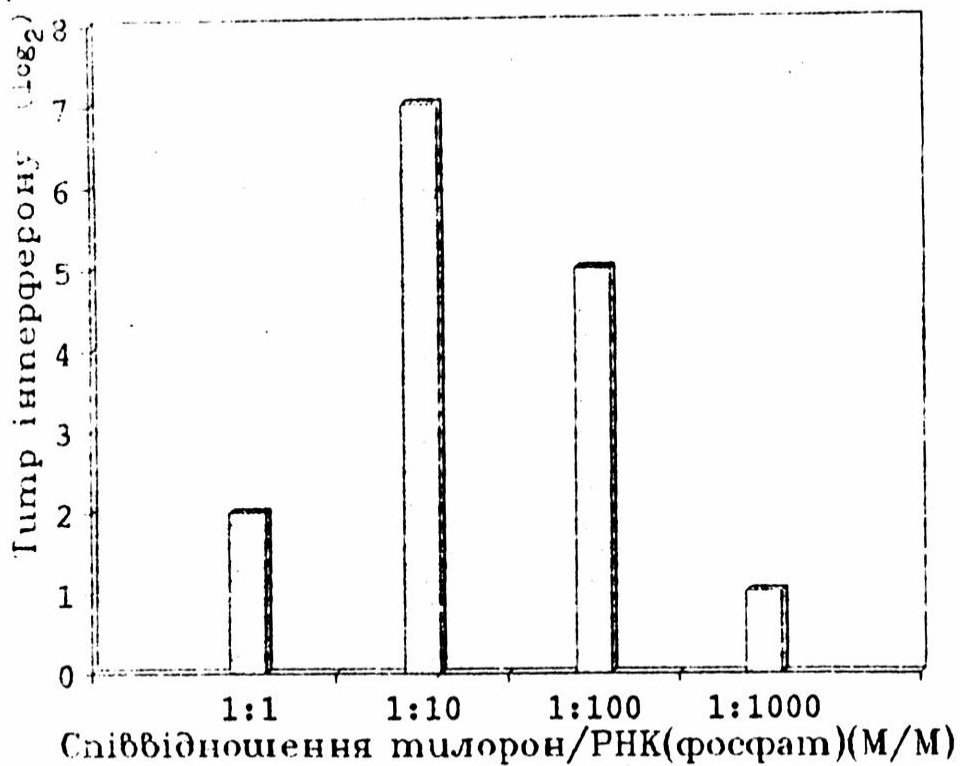
****Доза відповідає такій в складі МК.



Фіг. 1

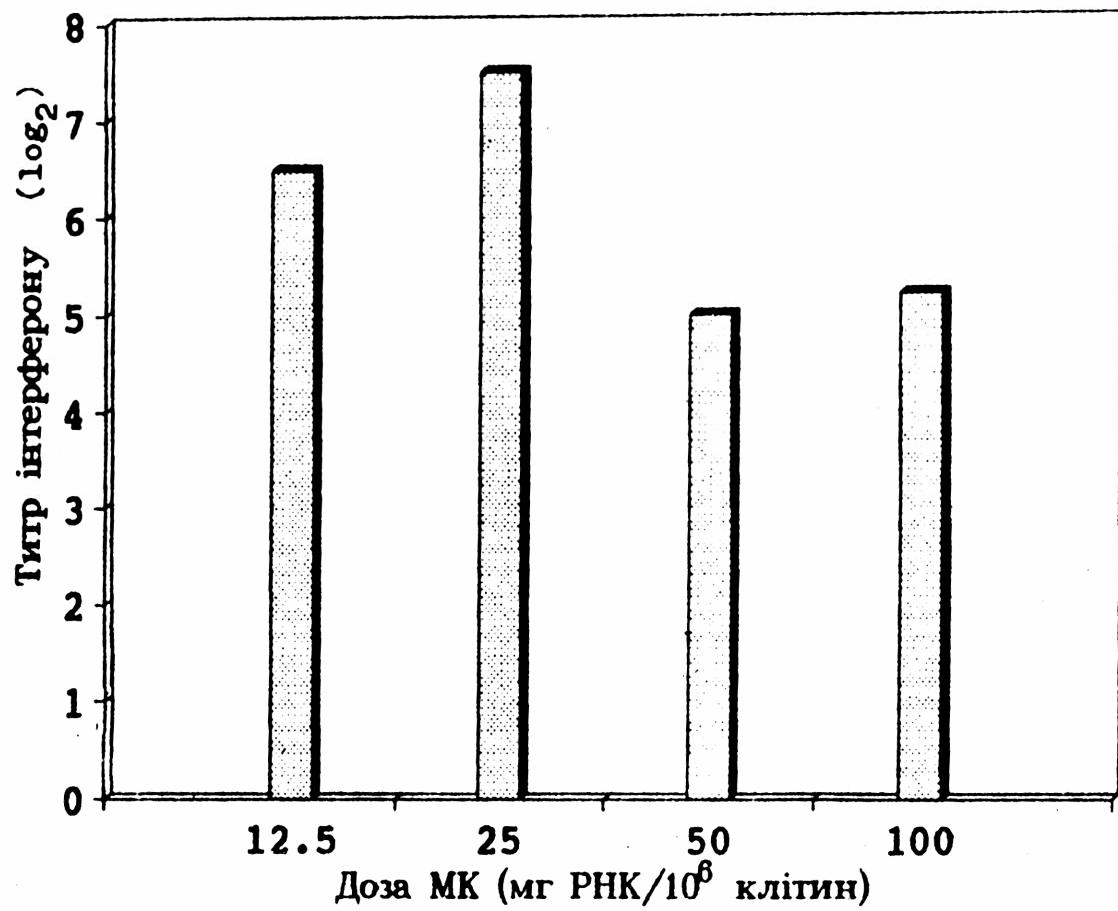
Динаміка накопичення інтерферону в поживному середовищі культури клітин L929 під дією МК*

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



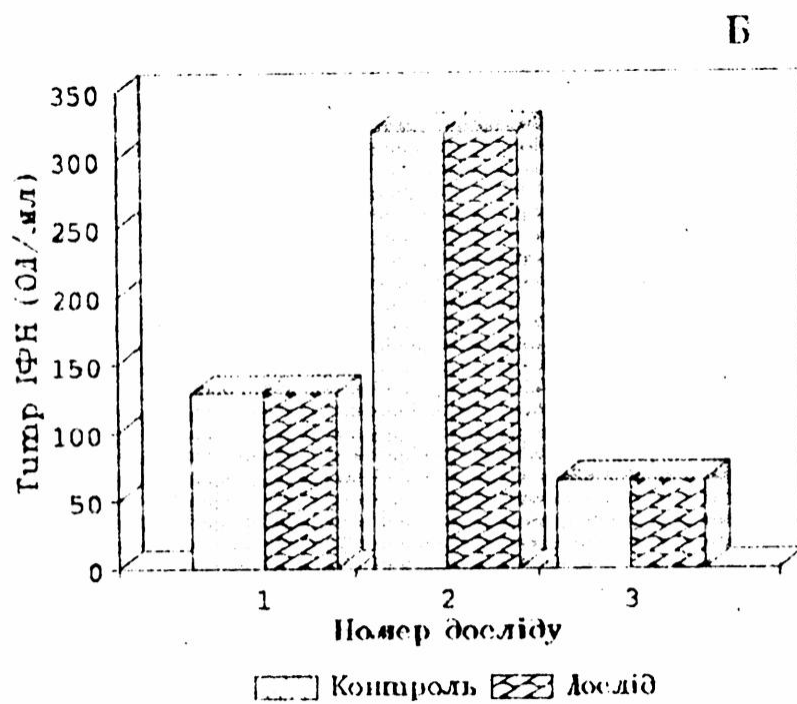
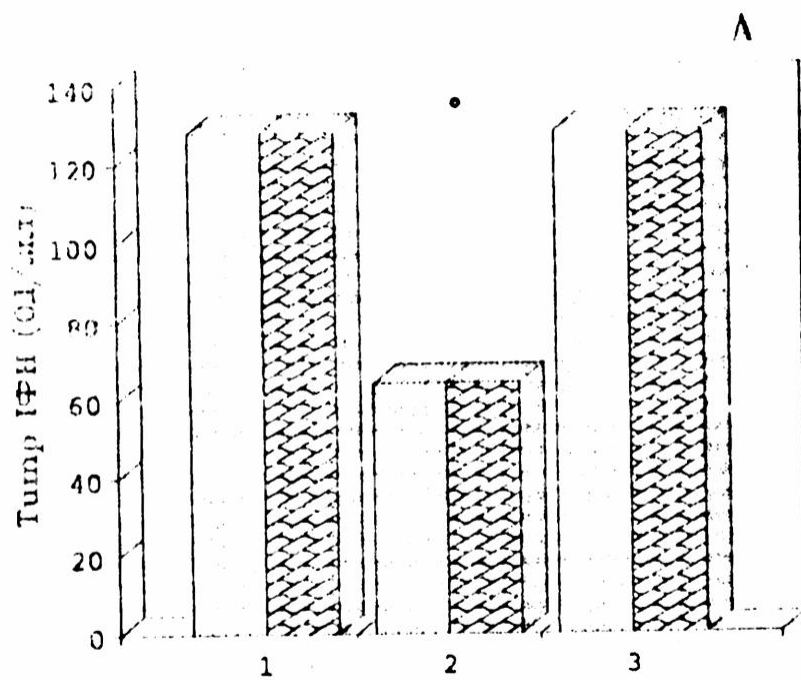
Фіг. 2

Вплив співвідношення компонентів на інтерферогенну здатність МК



Фіг. 3

Вплив дози МК на рівень інтерферону в культуральному середовищі клітин L929



Фіг. 4