

ТЕХНОЛОГІЧНІ ПАРАМЕТРИ КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН-ПРОДУЦЕНТІВ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ІНТЕРФЕРОНІВ І ТИПУ

Ю. М. Пенчук¹

О. В. Карпов¹

В. М. Поводзинський¹

С. В. Верьовка²

З. Р. Ульберг³

¹ Національний університет харчових технологій, Київ

² Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

³ Інститут біологічної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України, Київ

E-mail: penchuk-yuri@yandex.ru

Вивчали основні технологічні параметри культивування клітин-продуцентів інтерферону І типу (α/β -ІФН) у створеній авторами дослідній установці з використанням як індуктора молекулярного комплексу дріжджова РНК-гідрохлорид тилорону, іммобілізованого на гранулах сферону-300 (ІММК). Досліди проводили на мононуклеарних клітинах крові людини (суспензійна культура) та клітинах перещеплюваної лінії тестикулів поросят (моношарова культура). Визначено оптимальні співвідношення кількості клітин-продуцентів та частинок ІММК у середовищі культивування й оптимальні для культивування клітин швидкості перемішування культурального середовища для кожної з культур. Зроблено висновок щодо важливості точного визначення зазначених технологічних параметрів для застосування біореакторів з метою одержання препаратів ІФН у виробничих умовах з використанням ІММК.

Ключові слова: інтерферон, індуктор, іммобілізація, сферон, культура клітин, ролерне культивування, мононуклеари.

У сучасних біотехнологіях, що ґрунтуються на використанні культур еукаріотичних клітин-продуцентів біологічно активних сполук застосовують різноманітну за конструкцією апаратуру. Вибір того чи іншого способу культивування та відповідного апаратурного оформлення процесу визначається фізіологічними особливостями (суспензійна чи моношарова культура) і потребами клітинної культури, методами керування процесом, а також способом накопичення (екзо- чи ендогенним) цільового продукту або біомаси клітин [1,2].

Раніше нами було запропоновано принципово новий індуктор інтерферонів (ІФН) типу І: молекулярний комплекс дріжджова РНК-гідрохлорид тилорону, іммобілізований на гранулах сферону (ІММК) [3]. З метою відпрацювання технології одержання в культурах еукаріотичних клітин препаратів ІФН із використанням ІММК сконструювали й випробували дослідну установку як прототип апаратури для виробництва препаратів ІФН у промислових умовах. Доведено ефективність цієї установки щодо підтримання життєздатності культивованих

у ній клітин-продуцентів ІФН різного типу, а також здатності таких клітин до вищого, ніж за стаціонарних умов, продукування ІФН [4]. Метою даної роботи було встановлення основних технологічних параметрів культивування клітин в установці з використанням ІММК, а саме: 1) оптимального співвідношення кількості клітин-продуцентів ІФН та частинок ІММК у середовищі культивування; 2) оптимальної для культивування клітин інтенсивності перемішування культурального середовища.

Матеріали і методи

Клітини-продуценти ІФН. Досліди проводили на перещеплюваній лінії клітин тестикулів поросят (ПТП), отриманій з НДІ ветеринарії УААН (моношарова культура), та первинній культурі мононуклеарних клітин крові людини (суспензійна культура). Культивування клітин здійснювали, як описано раніше [4]. Клітини суспензійної культури (мононуклеари крові) вносили в місткості для культивування одночасно із зависсю ІММК. У разі моношарової культури ПТП

клітини перед внесенням ІММК підрощували в місткостях для культивування протягом однієї доби на середовищі з 10% -ї сироватки великої рогатої худоби (НВП «Біо-Тест-Лабораторія», Україна) для утворення суцільного моношару на внутрішній поверхні стінок місткостей.

ІММК. Інтерфероногенний молекулярний комплекс є конструкцією на основі гранул сферону-300 (Lachema, Чехія) з ковалентно приєднаними до цих гранул молекулами одноланцюгової дріжджової РНК (НПО «Біохімреактив», Латвія), інтеркальованими після приєднання молекулами гідрохлориду тилорону (Sigma, США). Приготування ІММК здійснювали відповідно [3,5].

Готуючи вихідну завесь ІММК, виходили з таких розрахунків. Оскільки об'єм однієї гранули сферону-300 в набухлому стані становить 10^{-11} см³ (згідно з інструкцією виробника), приблизна кількість частинок ІММК за наших дослідних умов дорівнюватиме $7 \cdot 10^9$. При цьому кількість клітин-продуцентів ІФН у вихідних клітинних завесях була на рівні $1-5 \cdot 10^6$ кл/мл. Користуючись вихідною зависсю ІММК, одержували низку місткостей ІММК із клітинами у певних дослідних співвідношеннях, які вносили у відповідні місткості й культивували в установці за відповідного режиму.

Дослідна установка. В основу дії створеної нами дослідної установки було покладено принцип ролерного переміщення горизонтально закріплених місткостей для культивування. Установку конструювали як універсальну, маючи на увазі можливість культивувати як моношарові, так і суспензійні культури. Опис та схему установки наведено раніше [4].

За допомогою електронного блоку здійснювали керування вихідними параметрами системи — швидкістю обертання вала та дискретністю зміни швидкості його обертання. Регулювання процесу культивування виконував оператор через персональний комп'ютер за допомогою програми BioTech v.1, що дозволяло користуватися певними режимами обертання вала впродовж фіксованих проміжків часу залежно від технологічних потреб.

Визначення кількості живих клітин у зразках здійснювали методом виключення барвника живими клітинами під час фарбування 0,1% -м розчином трипанового синього в ізотонічному розчині NaCl згідно зі стандартною методикою [6].

Титрування ІФН у зразках проводили відповідно до стандартної методики [7], ви-

користовуючи як тест-вірус вірус везикулярного стоматиту штаму Індіана у дозі 100 ТЦД₅₀.

Результати та обговорення

Раніше нами було встановлено, що початковим етапом синтезу ІФН клітинами-продуцентами, індукованими ІММК, є безпосередній контакт їх із частинками цього інтерфероногену [6]. Очевидно, що вірогідність здійснення таких контактів в умовах місткості для культивування клітин відповідатиме статистичним закономірностям і залежатиме передусім від кількості як клітин-продуцентів, так і частинок ІММК у розчині. Однак вплив зазначених контактів на життєздатність культивованих клітин та їхню спроможність продукувати ІФН є досить імовірним і водночас багатфакторним феноменом, що потребує експериментальної оцінки. З огляду на це для оптимізації біосинтезу ІФН у разі використання ІММК як індуктора надзвичайно важливим є попередній дослідний підбір оптимального для інтерфероногенезу співвідношення кількості клітин-продуцентів до частинок ІММК. Результати такого підбору для конкретних місткостей для культивування з відповідними об'ємними параметрами, які ми використовували (об'єм — 15 мл, внутрішня поверхня — 28 см², коефіцієнт заповнення — 0,7) [4], наведено на рис. 1.

Як видно, присутність частинок ІММК у середовищі культивування в кількостях, що перевищують кількість культивованих клітин (10/1), негативно впливає як на їхню життєздатність (рис. 1, а), так і на спроможність до інтерфероногенезу (рис.1, б). Це, можливо, пояснюється надлишком контактів між клітинами та частинками ІММК з відповідними необоротними порушеннями структури клітинних мембран. При цьому слід відзначити, що частинки сферону-300, на основі якого було створено ІММК, у набухлому стані мають об'єм 10^{-11} см³, що практично на порядок перевищує об'єм середньої еукаріотичної клітини, і тому потенційно здатні не тільки завдавати механічних ушкоджень клітинам, але й пасивно перешкоджати трансмембранному проходженню іонів та субстратів до клітини.

Близьким до оптимального за обома параметрами згадане співвідношення стає на рівні 1/10 для обох типів культур. І хоча за меншої кількості частинок ІММК у випадках обох культур спостерігалася дещо більша кількість життєздатних клітин, титри одер-

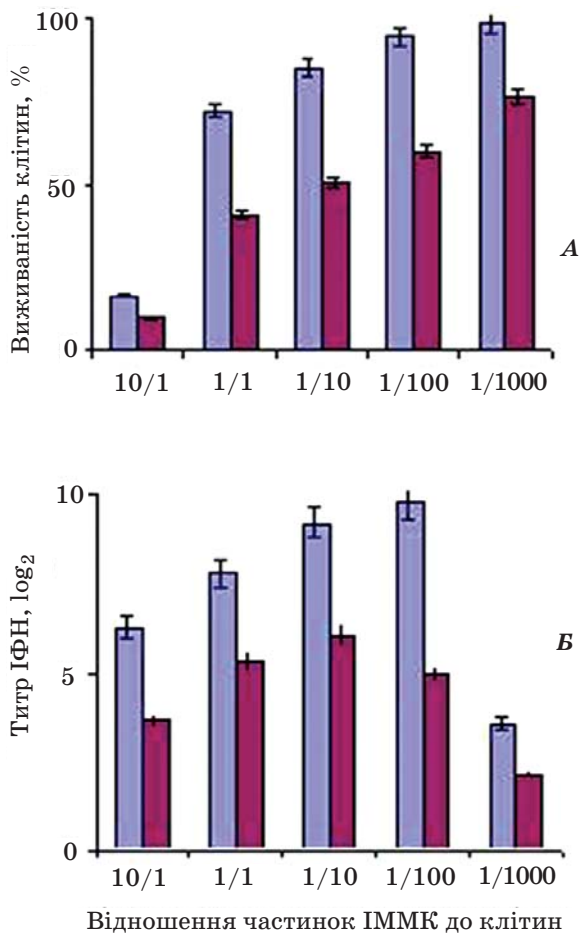


Рис. 1. Залежність життєздатності клітин (А) та виходу синтезованого ІФН (Б) від співвідношення частинок ІММК до клітин у місткостях для культивування:

■ — суспензійна культура (мононуклеарні клітини крові людини);
 ■ — моношарова культура (ПТП). Вимірювання проводили на 12-ту годину культивування

жаного ІФН достовірно знижувалися на 7 одиниць для лейкоцитів ($p > 0,05$) та на 3 одиниці для ПТП ($p > 0,05$) імовірно внаслідок зменшення кількості контактів ІММК з клітинами-продуцентами, які зумовлюють включення процесу індукції ІФН. Те, що зниження титрів ІФН не було пропорційним зменшенню кількості частинок ІММК у середовищі, зокрема, свідчить, що після зіткнення клітин із частинками ІММК останні не утримують клітини на своїй поверхні, а й далі вільно переміщуються у розчині, здійснюючи подальші контакти, які також спричинюють індукування ІФН іншими клітинами.

Поряд з іншими впливовими факторами забезпечення життєдіяльності клітин ссавців, до яких зазвичай відносять температурний режим (у межах 36–37 °С) та рівень рН середовища (7,2–7,5), чого ми до-

тримувались у наших дослідах, велике значення в умовах культивування *in vitro* мають чинники, пов'язані з рухом середовища. До таких чинників, належить передусім гідродинаміка системи, яка визначає інтенсивність потоків живильного середовища. Тимчасом як значення рН та температури є величинами практично сталими для всіх типів клітин і не залежать від конструктивних особливостей апаратури, швидкість перемішування культурального середовища впливає на гідродинаміку та, відповідно, на масопередачу в місткостях для культивування і, у такий спосіб, на забезпечення клітин киснем. Як моношарові, так і суспензійні культури клітин є дуже чутливими до змін у кисневому споживанні. Це, у свою чергу, відбивається на життєздатності клітин, а отже й на біосинтезі культурою цільового продукту — у нашому випадку ІФН. Слід також зважати й на залежність кількості здійснених контактів клітин з ІММК від швидкості обертання місткостей. Тому надзвичайно важливим було встановлення інтенсивності перемішування культурального середовища, оптимальної для культивування конкретних клітин у дослідній установці. Для цього вивчали залежність життєздатності клітин обох типів та інтерферогенезу від швидкості обертання вала з розміщеними на ньому місткостями для культивування. При цьому час культивування умовно поділили на три проміжки по дві години, які наближено відповідали фазі контакту ІММК та передачі індукційного сигналу, фазі продукування ІФН і фазі початку рефрактерності.

Отримані дані наведено на рис. 2 та рис. 3. Як видно, на першому етапі культивування, коли відбувається індукування ІФН (рис. 2, а), підвищення швидкості обертання достовірно збільшувало життєздатність клітин суспензійної культури на 20–25% ($p > 0,05$) і, водночас, зменшувало її у клітин моношарової культури на 10% ($p > 0,05$) через змив із поверхні. Така сама тенденція спостерігалася й на подальших фазах культивування (рис. 2, б, в). Це явище, на наш погляд, можна пояснити фізіологічними відмінностями росту зазначених культур в умовах використаних для культивування місткостей. У той час як клітини суспензійної культури за умови підвищеної швидкості обертання одержували більше кисню й поживних речовин, клітини в моношарі не встигали отримувати достатльк кисню за короткий час перебування в газовому оточенні, а поживні речовини за такого циклічного руху уздовж поверхні клітинного моношару також не встигали

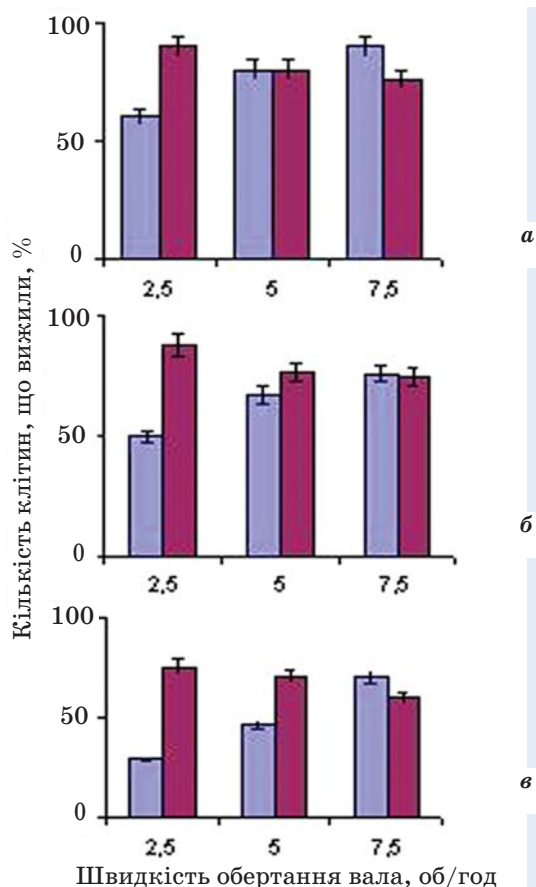


Рис. 2. Залежність життєздатності культивованих клітин від швидкості обертання вала установки упродовж фаз культивування:
a — фаза контакту ІММК та передачі індукційного сигналу; *б* — фаза продукування ІФН; *в* — фаза початку рефрактерності;
 ■ — суспензійна культура (мононуклеарні клітини крові людини);
 ■ — моношарова культура (ПТП)

достатньою мірою потрапляти до клітин. До того ж збільшення швидкості обертання вала і, як наслідок, підвищення рівня гідродинамічних зусиль, що виникають при цьому, порушує процес прикріплення моношарових клітин до поверхні місткостей для культивування; у результаті порушується загальна життєздатність клітин.

Що стосується синтезу ІФН клітинами, то в суспензійній культурі клітин на першому етапі культивування цей процес помітно інтенсифікувався зі збільшенням швидкості обертання вала установки на 1,5–2 одиниці. Водночас у моношаровій культурі інтерферогенез практично не залежав від згаданого параметра (рис. 3, *a*). Ми вважаємо, що підвищення рівня продукування ІФН у першому випадку зумовлено збільшенням кількості контактів, які відбуваються між частинками

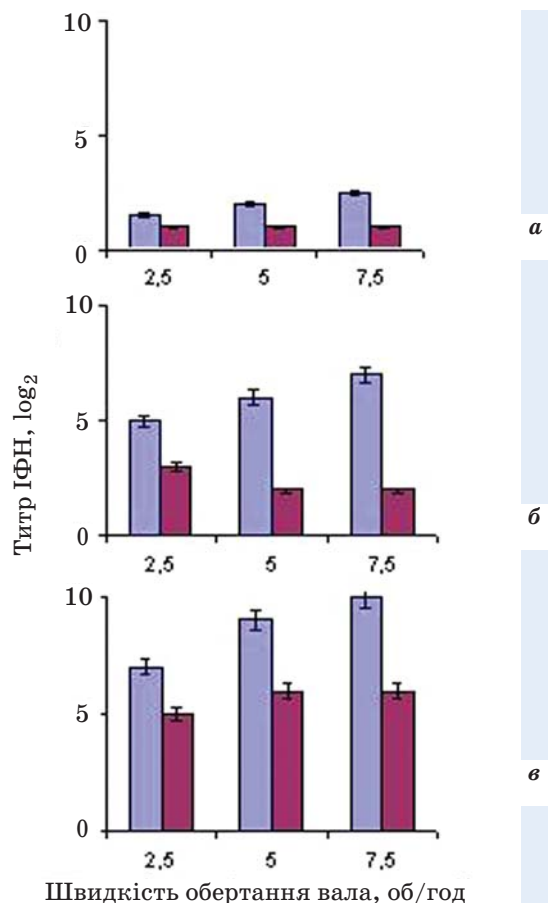


Рис. 3. Залежність продукування ІФН клітинами-продуцентами від швидкості обертання вала установки упродовж фаз культивування:
a — фаза контакту ІММК та передачі індукційного сигналу; *б* — фаза продукування ІФН; *в* — фаза початку рефрактерності;
 ■ — суспензійна культура (мононуклеарні клітини крові людини);
 ■ — моношарова культура (ПТП)

ІММК та поверхнею клітин-продуцентів і зумовлюють запуск індукції ІФН. У разі ж моношарової культури кількість таких контактів практично не змінюється, оскільки її обмежує кількість клітин-продуцентів ІФН, що містяться на зовнішній поверхні моношару.

Другий і третій етапи культивування (рис. 3, *б*, *в*) також характеризувалися підвищенням продукування ІФН клітинами суспензійної культури зі збільшенням швидкості обертання вала установки, що може пояснюватися більшою кількістю клітин-продуцентів, присутніх на цих етапах у місткостях. Слід відзначити і досить суттєве збільшення кількості ІФН, продукованого клітинами моношарової культури на третьому етапі культивування зі збільшенням швидкості обертання вала. Можливо, цей феномен зу-

мовлений ефективнішим вивільненням синтезованого ІФН з поверхні клітинного моношару за умов більш інтенсивного перемішування маси рідини живильного середовища. Загалом же, оптимальною для синтезу ІФН швидкістю обертання на всіх етапах під час культивування суспензійної культури моноцитів слід вважати 7,5 об/год, а в разі культивування моношарової культури ПТТІ — 5 об/год.

Підсумовуючи, слід наголосити, що результати проведеного дослідження свідчать про важливість підбору основних технологічних параметрів культивування клітин-продуцентів ІФН за своєрідних умов технології з використанням гранул ІММК як інтерферону. Вочевидь, застосування більш об'ємної апаратури для культивування клітин і, відповідно, потужніших пристроїв для перемішування культурального середовища (лопатових і турбінних мішалок або імпелерів різних конструкцій) потребуватиме в кожному разі окремого визначення оптимальних співвідношень кількості клітин-продуцентів та частинок ІММК у середовищі, а також оптимальної швидкості перемішування. При цьому правильне визначення цих параметрів прямо впливатиме на продуктивність використання біореакторів для одержання препаратів ІФН у виробничих умовах за такою технологією.

ЛІТЕРАТУРА

1. Nelson K. L., Geyer S. Bioreactor and process design for large-scale mammalian cell culture manufacturing // *Bioprocess Technol.* — 1991. — V.13. — P. 112–143.
2. Runstadler P. W. The importance of cell physiology to the performance of animal cell bioreactors // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 1992. — V. 665. — P. 380–390.
3. Карпов А. В., Пенчук Ю. Н., Верева С. В. Применение иммобилизованных индукторов в технологии получения природных интерферонов I типа в культурах клеток. Использование гранулярных носителей // *Биотехнология.* — 2006. — №1. — С. 30–35.
4. Пенчук Ю. М., Карпов О. В., Поводзинский В. М. та ін. Оцінка ефективності дослідної установки для одержання інтерферонів I типу // *Біотехнологія.* — 2008. — № 1. — С. 80–85.
5. Карпов О. В., Верьовка С. В., Манджос О. П. та ін. Індукція інтерферонів I типу в умовах *in vitro* за допомогою іммобілізованого комплексного інтерферогену // *Доп. НАН України.* — 2003. — №9. — С. 178–181.
6. Doyle A., Griffiths J. *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology.* — John Willey and Sons, 1998. — 332 p.
7. Ершов Ф. И., Новохатский А. С. Интерферон и его индукторы. — М.: Медицина, 1980. — 193с.

**ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК-
ПРОДУЦЕНТОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ
ИНТЕРФЕРОНОВ I ТИПА**

*Ю. Н. Пенчук¹
А. В. Карпов¹
В. Н. Поводзинский¹
С. В. Вережка²
З. Р. Ульберг³*

¹ Национальный университет
пищевых технологий, Киев

² Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

³ Институт биокolloидной химии
им. Ф. Д. Овчаренко НАН Украины, Киев

E-mail: penchuk-yuri@yandex.ru

Изучали основные технологические параметры культивирования клеток-продуцентов интерферона типа I (α/β -ИФН) в созданной авторами опытной установке с использованием в качестве индуктора молекулярного комплекса дрожжевая РНК–тилорона гидрохлорид, иммобилизованного на гранулах сферона-300 (ИММК). Опыты проводили на мононуклеарных клетках крови человека (сuspension культура) и клетках перевиваемой линии тестикулов поросят (monosloynaya культура). Определены оптимальные соотношения количества клеток-продуцентов и частиц ИММК в среде культивирования и оптимальные для культивирования клеток скорости перемешивания культуральной среды для каждой из культур. Сделан вывод относительно важности точного определения указанных технологических параметров при использовании биореакторов для получения препаратов ИФН в производственных условиях с использованием ИММК.

Ключевые слова: интерферон, индуктор, иммобилизация, сферон, культура клеток, роллерное культивирование, мононуклеары.

**THE TECHNOLOGICAL PARAMETERS
OF CULTIVATION CELLS WHICH
ARE PRODUCERS OF TYPE I
INTERFERONS**

*Yu. M. Penchuk¹
O. V. Karpov¹
V. M. Povodzinsky¹
S. V. Veriovka²
Z. R. Ul'berg³*

National University of Food Technologies, Kyiv

²Palladin Institute of Biochemistry of National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

⁴Ovcharenko Institute of Biocolloid Chemistry
of National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

E-mail: penchuk-yuri@yandex.ru

The authors investigated the main technological parameters of cultivation of interferon type I (α/β -IFN) producing cells in home-made experimental device; the yeast RNA-tilorone hydrochloride molecular complex immobilized on Sferon-300 beads (IMMC) was used as an IFN inducer. The experiments were made using human blood mononuclear cells (suspension culture) and established testicular porcine cells (monolayer culture). The authors determined the optimal producing cell quantity/IMMC beads ratios as well as the optimal cultural medium stirring velocity for each culture. There are conclusions concerning the importance of parameters mentioned above using bioreactors to obtain IFN preparations during large-scale cultivation using the IMMC.

Key words: interferon, inductor, immobilization, spheron, cell culture, roller cultivation, mononuclears.