

ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ДОСЛІДНОЇ УСТАНОВКИ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ІНТЕРФЕРОНІВ І ТИПУ

Ю. М. Пенчук¹

О. В. Карпов¹

В. М. Поводзинський¹

С. В. Верьовка^{2,3}

З. Р. Ульберг⁴

¹Національний університет харчових технологій, Київ

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

³Інститут отоларингології ім. О. С. Коломійченка АМН України, Київ

⁴Інститут біоколоїдної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України, Київ

E-mail: penchuk-yuri@yandex.ru

Описано експериментальну установку з програмованою дією для культивування клітин та здійснення ними індукovanого біосинтезу інтерферонів (ІФН) типу I за допомогою розроблених раніше частинок іммобілізованого комплексного індуктора (ІММК) багаторазової дії. Показано її ефективність у разі культивування як моношарових, так і суспензійних клітин-продуцентів ІФН. Вивчено фізіологічні умови культивування клітин обох типів в установці. Зроблено висновок щодо доцільності використання установок такого типу для одержання біологічно активних речовин в умовах застосування даної технології.

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

У зв'язку з широким використанням у сучасній лікарській практиці препаратів інтерферонів (ІФН) досить актуальним є вдосконалення технології одержання їх в умовах великомасштабного виробництва.

Ключовим етапом біосинтезу природного ІФН є процес індукції, тобто позаклітинної активації відповідних генів клітин-продуцентів [1], що культивуються в умовах *in vitro* як у флаконах, так і в спеціальних установках, подібних до мікробіологічних ферментерів [2,3]. Нещодавно нами запропоновано принципово новий індуктор ІФН I типу — молекулярний комплекс дріжджова РНК-гідрохлорид тилорону, іммобілізований на гранулах сферону (ІММК) [4,5]. ІММК має суттєві переваги перед індукторами, які застосовують зараз у виробництві природного ІФН типу I [6]. Однак використання ІММК потребує деякої модифікації процесу ролерного біосинтезу ІФН, що є найпоширенішим в Україні. Тому метою даної роботи стало розроблення відповідного апаратурного оформлення біосинтезу ІФН із застосуванням ІММК як індуктора.

Для вивчення відповідності сконструйованої нами дослідної установки меті й завданням зазначеної технології було проведено такі дослідження: 1 — загальна оцінка ефективності культивування клітин і біосинтезу ІФН у дослідній установці порівняно зі стаціонарними умовами культивування; 2 — експериментальне визначення співвідношення робочого об'єму клітинної суспензії і загального об'єму місткості для культивування, оптимального для моношарової та суспензійної культур.

Матеріали і методи

Клітини-продуценти ІФН. Досліди проводили на перещеплюваній лінії клітин тестикулів поросят (ПТП), отриманій з НДІ ветеринарії УААН (моношарова культура), а також на первинній культурі мононуклеарних клітин людини (суспензійна культура), які виділяли з периферійної крові групи I(0) у градієнті фікол-урографін ($p = 1,077$) за стандартною методикою [7]. Культивування клітин як у дослідній установці, так

і в стаціонарних умовах здійснювали відповідно до загальноприйнятого методу [8], використовуючи живильне середовище 199 (НВП «Біо-Тест-Лабораторія», Україна) з додаванням 5–10% ембріональної сироватки телят (Serva, Німеччина), 25 мМ/мл НЕРЕС (Serva), 10 мМ/мл L-глутаміну та антибіотиків пеніциліну, стрептоміцину або канаміцину в загальноприйнятих дозах при 37 °С і 5% -му вмісті двооксиду вуглецю в газовій фазі. У випадку суспензійної культури (мононуклеари) в місткості для культивування попередньо вносили завесь клітин у концентрації приблизно 10^6 – $5 \cdot 10^6$ кл./мл. У разі культивування моношарової культури клітини ПТП 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.

Клітинну масу мононуклеарних лейкоцитів відмивали розчином версену, довели до відповідної концентрації живильним середовищем і вносили в місткості для культивування. Моношарову культуру вносили безпосередньо в місткості для культивування, після чого проводили підрощування культури з метою утворення суцільного моношару. Швидкість обертання вала в цьому разі становила 12 об/год у перші дві години для закріплення клітин на поверхні флаконів та 5 об/хв — при подальшому культивуванні. Після цього відпрацьоване середовище зливали й замінювали новим з додаванням індуктора.

ІММК (інтерферогенний молекулярний комплекс) — це конструкція на основі гранул сферону 300 (Spheron 300 (LC) 63–100 μ m, Lachema, Чехія), до яких ковалентно приєднуються молекули одноланцюгової дріжджової РНК (НПО «Біохімреактив», Латвія), інтеркальовані гідрохлоридом тилорону (Sigma, США). Приготування ІММК детально описано нами раніше [4–6]. ІММК вносили в місткості у співвідношенні 0,1 мл завесі ІММК /1,5 мл робочого об'єму місткості, клітини-продуценти — у концентрації $5 \cdot 10^6$ кл./мл.

Дослідна установка. Схему створеної нами дослідної установки наведено на рис. 1. В основу її дії покладено принцип ролерного перемішування горизонтально закріплених місткостей для культивування. Установку конструювали як універсальну для культивування як моношарових, так і суспензійних культур.

Установку зібрано на базі редукційного електродвигуна з максимальною швидкістю обертання вала 60 об/год. На валу двигуна розташований диск з отворами, в яких закріплюють місткості для культивування — скляні флакони об'ємом 15 мл, площа внутрішньої поверхні яких становить 28 см². Флакони закривають корками із силіконової гуми і закріплюють у перфорованому диску, фіксуючи їх спеціальним фіксатором — гумовим кільцем із зовнішнім діаметром 30 мм, внутрішнім — 12 мм, завтовшки 3–4 мм, розміщеним на горловині флакона.

Для підтримання температури на певному рівні установку розміщують у термостаті. Як датчик температури використовують термометр опору ТСП-5071 (Росія), а як датчик обертів — магнітний датчик VDO 804/6/10 (Чехія). Точність підтримання температури в установці дорівнює $\pm 0,1$ °С, а швидкість обертання вала, на якому міститься робочий диск, — $\pm 0,1$ об/год від заданої швидкості.

Для регулювання процесу біосинтезу ІФН установку оснащено електронним блоком керування на базі двох мікроконтролерів, один з яких запрограмовано на керування швидкістю обертання диска та температурою інкубації, а другий — для запису цих параметрів у поточному режимі культивування клітин-продуцентів та накопичення ІФН у пам'яті комп'ютера.

Зв'язок електронного блока керування з комп'ютером відбувається через СОМ-порт за допомогою інтерфейсного блока, зібраного на базі мікросхеми MAX 233.

Контроль за технологічним процесом та введення згаданих параметрів культивування здійснювалось комп'ютером за допомогою програми BioTech v.1, розробленої спеціально для виконання цієї роботи.

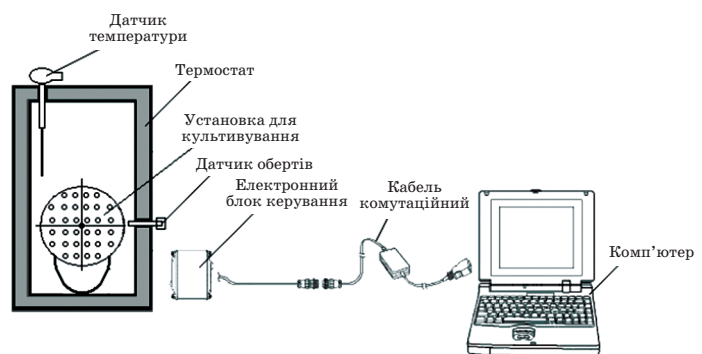


Рис. 1. Схема дослідної ролерної установки для культивування клітин та біосинтезу ІФН

Визначення життєздатності клітин у культурах здійснювали методом виключення барвника живими клітинами під час фарбування 0,1% -м розчином трипанового синього в ізотонічному розчині NaCl. Підрахунок пофарбованих і непофарбованих клітин проводили в гемоцитометрі за стандартною методикою [9].

Титрування ІФН у зразках виконували за стандартною методикою [10], використовуючи як тест вірус везикулярного стоматиту (штам Індіана) у дозі 100 ТЦД₅₀.

Результати та обговорення

Головним завданням даної роботи була оцінка ефективності культивування клітин і біосинтезу ІФН у дослідній установці в порівнянні зі стаціонарними умовами культивування. Оскільки таке культивування відбувається в умовах контакту клітин із частинками ІММК, важливо було простежити вплив цих частинок на загальну життєздатність клітин-продуцентів. Для ефективного біосинтезу ІФН такими клітинами важливим є підтримання ними високої життєздатності протягом усього періоду інтерферогенезу. Клітини ссавців, як правило, більші за мікроорганізми і не мають типових для останніх клітинних стінок, які забезпечують їхню механічну стійкість. Будь-які механічні зрушення, що відбуваються під час масообмінних процесів у середовищі культивування, негативно впливають на такі клітини [2,11,12]. У разі застосування ІММК як компонента рідкої фази, що покриває моношар субстратзалежних клітин-продуцентів і здійснює певний рух уздовж цього моношару, теоретично може відбуватись як деяке пригнічення життєздатності клітин (механічне пошкодження, зниження поглинальної здатності внаслідок зменшення ефективної поверхні клітин при створенні стабільного контакту з частинками ІММК), так і підвищення їхньої життєздатності (що є результатом інтенсифікації процесу мікроперемішування живильного середовища відносно моношару частинками ІММК). Аналогічних наслідків слід очікувати й у випадку суспензійних культур клітин. Таким чином, для запропонованої технології питання щодо життєздатності клітин-продуцентів ІФН стає ключовим.

Дані відповідних дослідів, проведених на обох типах клітинних культур, наведено на рис. 2, а, б.

З'ясовано, що культивування в дослідній установці значною мірою сприяє збереженню життєздатності клітин-продуцентів

порівняно з таким процесом у стаціонарних умовах. Так, у випадку моношарової культури (рис. 2, а) кількість клітин збільшується під час культивування в установці приблизно в 1,5 рази порівняно з вихідною концентрацією клітин, а в стаціонарних умовах зменшується, досягаючи нульового значення на 8-му годину культивування. У разі суспензійної культури мононуклеарних клітин крові людини (рис. 2, б) на 8-му годину культивування у стаціонарних умовах кількість клітин зменшується майже в 4 рази порівняно з культивуванням у дослідній установці.

Дані щодо кількості ІФН, синтезованого клітинами-продуцентами в дослідних умовах, підтверджують попередній висновок (рис. 3, а, б).

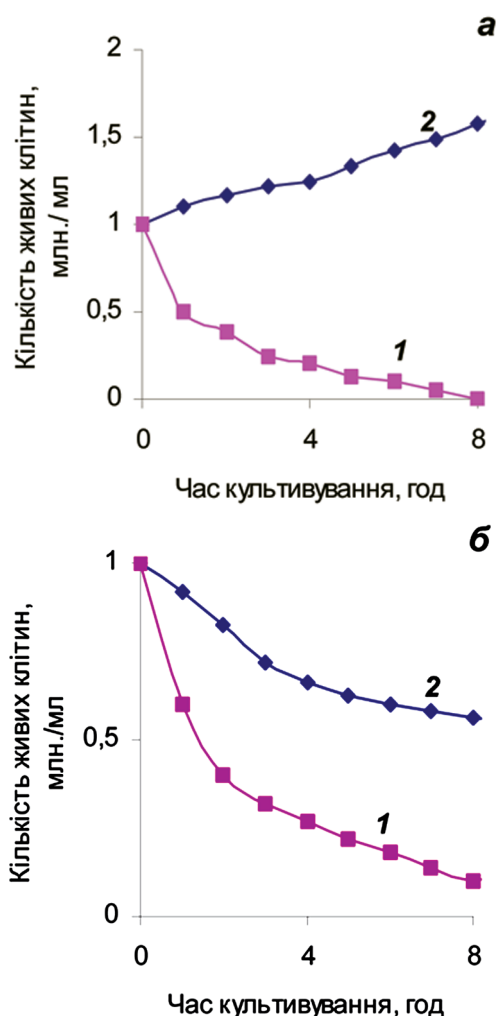


Рис. 2. Вплив умов культивування клітин-продуцентів ІФН із додаванням ІММК на життєздатність клітин:

- а — моношарова культура (ПТП);
- б — суспензійна культура (мононуклеарні клітини крові людини);
- 1 — стаціонарні умови;
- 2 — культивування в дослідній установці

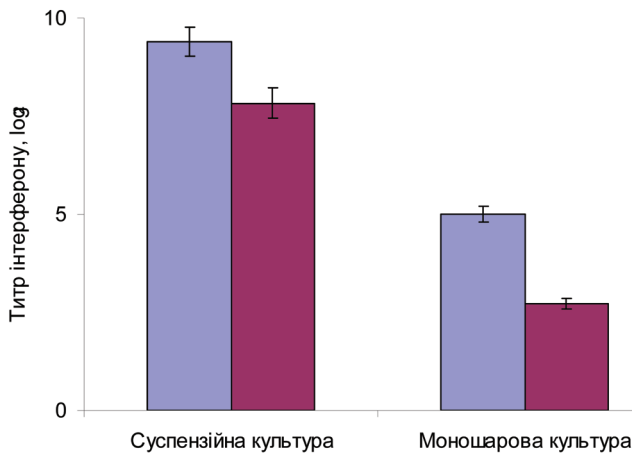


Рис. 3. Вплив умов культивування клітин-продуцентів ІФН із додаванням ІММК на кількість синтезованого ІФН:

- культукування в дослідній установці;
- стаціонарні умови культивування

Культивування обох досліджуваних нами типів культур клітин в установці приводить до накопичення ІФН у значно вищих титрах, ніж за стаціонарних умов. Таким чином, динамічні умови культивування обох типів культур, які забезпечуються в установці, дозволяють суттєво збільшити як життєздатність клітин-продуцентів, так і відповідно кількість синтезованого ними ІФН.

Вирішальними факторами забезпечення життєдіяльності клітин ссавців зазвичай вважають оптимальний температурний режим, рівень рН середовища (параметри, практично незалежні від конструктивних особливостей апаратів для культивування), а також забезпечення киснем [12, 13]. Однак умови культивування еукаріотичних клітин не вичерпуються переліченими і багато в чому визначаються типом застосовуваного біореактора, його геометричними параметрами, видом енергії, яка підводиться, складом живильного середовища тощо. Форма і об'єм місткостей для культивування клітин є досить суттєвими факторами, що впливають на ріст клітин у культурі, оскільки вони до певної міри визначають забезпечення клітин киснем і рівень рН шарів середовища, які безпосередньо оточують клітини, особливо у випадку моношарових культур [11, 12].

Серед доступних нам місткостей ми зупинилися на скляних циліндричних флаконах, які використовують у фармацевтичній промисловості для упакування антибіотиків, оскільки поверхня закріплення моношарових клітинних ліній в них є достатньою для накопичення клітинного матеріалу, необхідного для максимального продукування

ІФН. У разі застосування скляного посуду легко забезпечується його стерильність та можливість багаторазового використання.

При культивуванні клітин в установках ролерного типу, як, власне, й в інших, місткості для культивування заповнюються живильним середовищем не повністю з метою збільшити зону контакту клітинного матеріалу із цим середовищем, а також наситити середовище киснем без використання інтенсивних масообмінних процесів [14].

Співвідношення робочого об'єму суспензії клітин в місткості для культивування і загального об'єму цієї місткості є одним із ключових параметрів культивування клітин у культурах, оскільки саме від цього співвідношення залежать кількість кінцевого продукту та швидкість накопичення клітинного матеріалу у випадку моношарових клітинних ліній. Виходячи з попередньо заданих параметрів геометричного об'єму місткостей для культивування клітин та площі вільної поверхні флакона, на якому закріплюються клітини (15 мл та 28 см² відповідно), ми дослідно підбирали оптимальне співвідношення робочого об'єму суспензії клітинного матеріалу та індуктора (V_p) і загального об'єму місткості для культивування (V_3). Для конкретних умов нашої установки це співвідношення становило

$$V_p/V_3 = 1/10.$$

Таке співвідношення зазначених об'ємів забезпечує ефективну підтримку клітин-продуцентів у життєздатному стані впродовж усього процесу інтерферогенезу завдяки достатній кількості живильних компонентів та відсутності їх інгібування продуктами життєдіяльності клітин.

Культивування суспензії лейкоцитів не передбачає попереднього підрощування цих клітин, а той чи інший індуктор вноситься до місткостей для культивування одночасно з клітинною суспензією. Таким чином, культивування клітин у цьому разі зводилося до виконання таких етапів: 1) приготування зависі лейкоцитів із середньою концентрацією $2-4 \cdot 10^8$ кл./мл; 2) внесення клітинної зависі (об'ємом 1,5 мл) та живильного середовища певного складу в місткості для культивування; 3) індукції ІФН шляхом внесення індукторів в ємності з клітинами; 4) власне біосинтезу ІФН.

Моношарову культуру перед внесенням індукторів підрощували в місткостях для культивування протягом однієї доби на середовищі з 10% -ї сироватки великої рогатої худоби для утворення суцільного моношару на внутрішній поверхні стінок місткостей.

ЛІТЕРАТУРА

Одержання препаратів ІФН складалося з таких етапів: 1) приготування зависі клітин-продуцентів; 2) внесення клітинної зависі та живильних компонентів у місткості для культивування; 3) закріплення та підрощування клітин; 4) заміни живильного середовища; 5) індукції інтерферогенезу шляхом внесення індукторів у місткості з клітинами; 6) власне біосинтезу ІФН.

Попередньо вирощені у скляних флаконах об'ємом 500 мл з використанням середовища 199 із 10% -ї сироватки великої рогатої худоби моношарові клітинні лінії обробляли 0,02% -м розчином версену, витримували протягом 10 хв, після чого версен зливали. У флакон додавали невелику кількість середовища 199 із 10% -ї сироватки великої рогатої худоби та змивали клітини піпетуванням. Необхідну концентрацію клітин одержували, додаючи живильне середовище зазначеного складу.

Потім суспензію клітин у живильному середовищі з додаванням сироватки великої рогатої худоби вносили до флаконів (об'єм суспензії дорівнював 1,5 мл). Для одержання суцільного моношару клітини культивували протягом 24 год.

Після утворення суцільного моношару на внутрішній поверхні місткостей для культивування відпрацьоване живильне середовище замінювали на нове такого самого складу. Одночасно з новим середовищем вносили ІММК.

На результати цього етапу культивування суттєво впливає правильна орієнтація місткостей для культивування відносно площини диска, оскільки при похибці відбувається нерівномірний розподіл клітин уздовж внутрішньої поверхні місткостей. У такому разі площа клітинного моношару зменшується, що призводить до відповідного зниження виходу синтезованого ІФН. Корекцію кута нахилу місткостей здійснювали за допомогою фіксатора. У випадку ж суспензійної культури нахил флакона не впливав на вихід ІФН.

Таким чином, наведені результати досліджень свідчать про переваги застосування ролюерної установки порівняно зі стаціонарним культивуванням клітин у специфічних умовах використання ІММК як індуктора інтерферогенезу. Вважаємо, що подальші дослідження в цьому напрямі дозволять створити ґрунтовну експериментальну базу для впровадження зазначеної технології у фармацевтичне виробництво.

1. *Ho M.* Induction and inducers of interferon. // *Interferon 1. General and applied aspects* / Ed. A. Billiau — Amsterdam — N.Y. — Oxford: Elsevier, 1984. — P. 79–124.
2. *Ryu D. D., Nam D. H.* Recent progress in biomolecular engineering // *Biotechnol. Prog.* — 2000. — V. 16 — P. 2–16.
3. *Kretzmer G.* Industrial processes with animal cells // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2002 — V. 59, N2–3. — P. 135–142.
4. *Карнов О. В., Верьовка С. В., Манджос О. П. та ін.* Індукція інтерферонів І типу в умовах *in vitro* за допомогою іммобілізованого комплексного інтерферогену // *Доп. НАН України.* — 2003. — №9 — С. 178–181.
5. *Жолобак Н. М., Манджос А. П., Веревка С. В. и др.* Интерферогенное действие иммобилизованных рибополинуклеотидов *in vitro* // *Укр. биохим. журн.* — 2003. — Т. 75, №6 — С. 106–110.
6. *Карнов А. В., Пенчук Ю. Н., Веревка С. В.* Применение иммобилизованных индукторов в технологии получения природных интерферонов I типа в культурах клеток. Использование гранулярных носителей // *Биотехнология.* — 2006. — №1. — С. 3035.
7. *Иммунологические методы исследований* / Под ред. И. Лефковитса и Б. Пернуса — М.: Мир, 1988. — С. 232–240.
8. *Культуры животных клеток* / Под ред. Д. Фреши — М.: Мир, 1989. — 332 с.
9. *Doyle A., Griffiths J.* Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology. — John Willey and Sons, 1998. — 332 p.
10. *Ершов Ф. И., Новохатский А. С.* Интерферон и его индукторы. — М.: Медицина, 1980. — 193 с.
11. *Oka M. S., Rupp R. G.* Large-scale animal cell culture: a biological perspective // *Bioprocess Technol.* — 1990. — V. 10 — P. 71–92.
12. *Nelson K.L., Geyer S.* Bioreactor and process design for large-scale mammalian cell culture manufacturing // *Ibid.* — 1991. — V. 13 — P. 112–143.
13. *Reiter M., Bluml G.* Large-scale mammalian cell culture // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 1994 — V. 5, N2. — P. 175–179.
14. *Griffiths B.* Scale-up of suspension and anchorage-dependent animal cells // *Mol. Biotechnol.* — 2001. — V. 17. — P. 225–238.

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ
ОПЫТНОЙ УСТАНОВКИ
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ
ИНТЕРФЕРОНОВ I ТИПА**

**ESTIMATION OF EFFECTIVENESS
OF EXPERIMENTAL DEVICE
FOR OBTAINING
OF TYPE I INTERFERONS**

Ю. Н Пенчук¹
А. В Карпов¹
В. Н Поводзинский¹
С. В. Веревка^{2, 3}
З. Р. Ульберг⁴

Yu. M. Penchuk¹
O. V. Karpov¹
V. M. Povodzinsky¹
S. V. Veriovka^{2, 3}
Z. R. Ul'berg⁴

¹Национальный университет пищевых технологий, Киев

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

³Институт отоларингологии им. А. С. Колосийченко АМН Украины, Киев

⁴Институт биокolloидной химии им. Ф. Д. Овчаренко НАН Украины, Киев

E-mail: penchuk-yuri@yandex.ru

¹National University of Food Technologies, Kyiv

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

³Kolomiychenko Institute of Otolaryngology of Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv

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

E-mail: penchuk-yuri@yandex.ru

Описана экспериментальная установка с программируемым действием для культивирования клеток и осуществления ими индуцированного биосинтеза интерферонов (ИФН) I типа с помощью разработанных ранее частиц иммобилизованного комплексного индуктора (ИММК) многократного действия. Показана ее эффективность при культивировании как монослойных, так и суспензионных клеток-продуцентов ИФН. Изучены физиологические условия культивирования клеток обоих типов в установке. Сделан вывод о целесообразности использования установок такого типа для получения биологически активных веществ в условиях применения данной технологии.

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

The authors describe an experimental device with computer assisted action for cell cultivation and induced type I interferon (IFN) synthesis. The device is based on the use of previously elaborated particles bearing an immobilized complex inductor of repeated action. The device is shown to be effective for cultivation of both monolayer and suspended cells producing the IFN. Physiological conditions of both cell types cultivation are investigated. The authors conclude their device to be useful for obtaining of biologically active substances by this technology.

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