

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ. Д.К. ЗАВОЛОТНОГО

На правах рукопису

ІВАНЕНКО ВАЛЕРІЙ КОСТЯНТИНОВИЧ

**РОЗРОБКА СПОСОБУ ОТРИМАННЯ СВИНЯЧОГО ГАМА-ІНТЕРФЕРОНУ  
І ВИВЧЕННЯ ЙОГО ДЕЯКИХ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ТА БІОЛОГІЧНИХ  
ВЛАСТИВОСТЕЙ**

03.00.06 - вірусологія

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**  
дисертації на здобуття вченого ступеня кандидата  
біологічних наук

КИЇВ-1994



00755982 (-)

Розроблено у відділі вірусів мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук,  
професор, академік АНУ  
Я.Г.Кішко

Офіційні опоненти: доктор медичних наук В.А. Борисов  
кандидат біол. наук О.Ю. Повниця

Ведуча організація: НДІ епідеміології і інфекційних  
хвороб ім. Л.В. Громашевського  
МОВ України

Захист відбудеться "16" листопада 1994 року о 10<sup>00</sup> годині на засіданні Спеціалізованої Ради Д.016.06.01 при Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за адресою: 252143, Київ-143, вул. Заболотного 154.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Автореферат розісланий "16" жовтня 1994 року

Вчений секретар  
Спеціалізованої Ради  
кандидат біол. наук

*Пуріш* — Л.М. Пуріш

4B - 37.25a

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність проблеми.** Відкритий у 1957 р. /Isaaks, Lindenmann/ інтерферон привертає увагу спеціалістів молекулярної біології, біотехнології, медицини та ветеринарії. Це пояснюється виключно важливим значенням як теоретичного вивчення ролі інтерферону, так і його практичного застосування.

Імунний гама - інтерферон ( $\gamma$ -інтерферон) вперше було виявлено в надосадовій рідині культури лімфоцитів периферійної крові людини, обробленої фітогемаглотиніном /Wheelock, 1965/. Пройшло майже 30 років з моменту відкриття імунного інтерферону і в наш час уявлення про функції та роль гама-інтерферону в значній мірі розширились.

Актуальність вивчення інтерферону визначається не тільки антивірусною і протипухлинною дією, але й імуномодуючими та радіопротекторними активностями /Gresser, 1977/. Широкий спектр біологічної активності гама-інтерферону проявляється в посиленні експресії антигенів гістосумісності I та II класів не тільки на лімфоцитах, але й на інших типах клітин. Гама-інтерферон посилює бактерицидну і протипухлинну дію макрофагів, безпосередньо приймає участь у фазах імунної відповіді розпізнавання, проліферації та диференціювання, стимулює здатність природних кілерних клітин захищати організм від вірусних інфекцій.

Антивірусна активність інтерферону - лише одна з його функцій, тоді як, можливо, головною являється регуляція клітинних активностей, пов'язаних з ростом, диференціюванням і корекцією імунної відповіді.

Інтерферони продукуються клітинами багатьох, можливо, усіх видів хребетних. Крім інтерферонів людини, докладно

вивчені інтерферони мишей, курей, качок, у яких добре охарактеризовані  $\alpha$ - і  $\beta$ -інтерферони.

Природні свинячі  $\alpha$ - інтерферони привертають увагу дослідників тим, що мають до 64% гомології з людським  $\alpha_1$ -інтерфероном /Lefevre, La Bonnardiere, 1986/. Ці інтерферони активно вивчаються в багатьох лабораторіях світу /Соловьев и др., 1980; La Bonnardiere et al., 1984; La Bonnardiere et al., 1986; Piasecki, 1988).

З моменту свого відкриття в 1969 р. /Richmond/ свинячий  $\gamma$ -інтерферон до сьогоднішнього дня практично не вивчений, тому викликає інтерес підбір нових індукторів  $\gamma$ -інтерферону, які є нетоксичними і нешкідливими і які дозволяють отримувати більш високоактивний препарат, а також вивчення деяких фізико-хімічних і біологічних властивостей свинячого гама-інтерферону в порівняльному аспекті з більш дослідженим людським  $\gamma$ -інтерфероном.

**Мета та задачі дослідження.** Мета роботи - підбір нових індукторів гама-інтерферону, вивчення умов біосинтезу і деяких фізико-хімічних та біологічних властивостей свинячого гама-інтерферону.

Для виконання цієї мети були поставлені такі основні задачі досліджень:

- провести скринінг нових індукторів гама-інтерферону;
- розробити нові підходи для одержання препаратів свинячого гама-інтерферону, використовуючи нетрадиційні клітини-продукенти та індуктори інтерферону;
- охарактеризувати деякі фізико-хімічні та біологічні властивості отриманого препарату гама-інтерферону;

**Наукова новизна.** В результаті вивчення отриманого препара-

ту свинячого гама-інтерферону було вперше:

- підібрані нові ефективні індуктори гама-інтерферону - бактерійний лектин *Bacillus subtilis 668 IMB* та лектин в трави "золотий дощ" /Позитивне рішення на винахід СРСР N4935373, А.С. СРСР N1561273 /;
- розроблена і апробована оптимальна схема біосинтезу препарату свинячого гама-інтерферону / позитивне рішення Держпатенту України N94030717/;
- розроблені методи очистки гама-інтерферону свиней, встановлена його молекулярна маса та визначена ізоелектрична точка;
- препарату свинячого гама-інтерферону властива модулююча дія на функціональну активність фагоцитів крові свиней;
- свинячий гама-інтерферон захищає гомологічні клітини, людські клітини L-41 та клітини бика MDBK від дії вірусу везикулярного стоматиту.

**Практична цінність роботи.** Експериментальне вивчення біосинтезу гама-інтерферону з використанням нових індукторів, його деяких фізико-хімічних та біологічних властивостей дозволило розробити нормативно-технічну документацію, інструкцію по його використанню, а також впровадити цю розробку на Ладизинському ВВФО "Ензим".

**Апробація роботи.** Результати досліджень були викладені на науково - практичній нараді "Вірусологія народному господарству" (Київ, 1987); 11-th International Lectin Conference (Tartu, 1989), Всесоюзній нараді "Використання інтерферонів в ветеринарії" (Київ, 1989), 8-th International Congress of Virology (Berlin, 1990), Всесоюзній нараді "Сучасні аспекти застосування інтерферонів і інших імуномодуляторів (Москва,

1990), і установчому з'їзді Українського мікробіологічного товариства (Одеса, 1993).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 10 робіт, отримано 2 авторських свідоцтва СРСР, 1 позитивне рішення Держпатенту СРСР на винахід та 1 позитивне рішення Держпатенту України на патент України.

**Обсяг та структура дисертації.** Робота викладена на 115 аркушах друкованого тексту (враховуючи 15 малюнків та 11 таблиць). Дисертація складається із вступу, огляду літератури, розділу матеріалів та методів досліджень, 3-х розділів власних досліджень, розділу обговорення результатів, висновків та списку використаної літератури.

## З М І С Т   Р О Б О Т И

### *Матеріали та методи досліджень*

Загальну популяцію клітин селезінки свиней, Т- і В-лімфоцити виділяли відповідно Hunt (1990).

Моно- і полінуклеари виділяли із гепаринизованої крові свиней шляхом центрифугування на градієнті щільності фікол-верографіну 1.6 ( $\rho=1,077$  г/см<sup>3</sup> і 1,12 г/см<sup>3</sup>). Моноцити і нейтрофіли виділяли із відповідних фракцій шляхом адгезії на пластиковій поверхні (протягом 40 хв. при 37°C), після чого клітини знімали механічно, відмивали і підраховували. Життєздатність моноцитів і нейтрофілів оцінювали після фарбування трипановим синім.

Як індуктори інтерферону використовували комерційний препарат рослинного лектину Concanavalin A (Pharmacia), L-фукозоспецифічний очищений лектин із рослини "золотий дощ" (*Laburum anagyroides Medik*), позаклітинні лектини, що виділені із культуральної рідини бактерій роду *Bacillus* (B.

*subtilis* 316M, *B. subtilis* 668, *B. polytuxa*), що являють собою глікопротеїни, які мають унікальну специфічність до сіалових кислот; високу питому активність з молекулярною масою 120000 Д (отримані з відділу промислових мікроорганізмів ІМВ НАНУ від Е.О. Коваленко і І.О. Симоненко). Дослідження проводили з напівочищеними лектинами *B. subtilis* 316M (гемаглютинуюча активність ГАА - 1 : 512, концентрація білка 0,81 мг/мл), *B. subtilis* 668 ІМВ (ГАА - 1 : 5536, концентрація білка 0,69 мг/мл), *B. polytuxa* 112 (ГАА - 1 : 16384, концентрація білка 0,62 мг/мл) і очищеними *B. subtilis* 316M (питома активність лектину 2560 титр<sup>-1</sup>/мг білка), *B. subtilis* 668 ІМВ (питома активність лектину 42024 титр<sup>-1</sup>/мг білка).

Активність препаратів  $\gamma$ -інтерферонів визначали мікрометодом по пригніченню цитопатичного ефекту тест-віруса везикулярного стоматиту (штам Індіана) в дозі 100 ТЦД<sub>50</sub> на гомологічних клітинах ПСП, СПЕВ /Grossberg et al., 1984/.

Очистку  $\gamma$ -інтерферону починали преципітацією білків 80% сульфатом амонію. Осаджені білки хроматографували на колонці з великопористим склом CPG-10 (Sigma) відповідно Braude /1983/. Отримані фракції аналізували на вміст білка за методом Лоурі, а також на антивірусну активність. Фракції, що мають антивірусну активність після хроматографії на CPG, об'єднували і вносили в пластикову колонку (D-3 см), заповнену Con A-Sepharose (Pharmacia) /Rinderknecht, 1984/. У фракціях, отриманих після хроматографії з вастосуванням Con A-Sepharose визначали кількість білка і антивірусну активність. Ті з них, які мали антивірусну активність, об'єднували і діалізували проти 0,2М амоній-ацетатного буферу

(рН-6,0) + 0,15М NaCl. Діалізат концентрували за допомогою Aquacid-2 (Calbiochem). Вілковий концентрат розділяли гель-фільтрацією на колонці в біогелем Р-100 (1,6×95 см), попередньо відкаліброваною білками в відомою молекулярною масою (BSA-68000, овальбумін-43000, хімотрипсиноген-25000, РНКаза А-13700, Serva) відповідно Yip et al., 1981.

Досліди по ізоелектрофокусуванню свинячого  $\gamma$ -інтерферону проводили відповідно Havell /1977/.

Чистоту виділеного інтерферону та його молекулярну масу визначали за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі за методом Laemmli /1970/.

Тип отриманого інтерферону визначали по його здатності зберігати активність при закисленні рН до 2,5 досліджуваного зразка і прогріванні при 56°C на протязі 30 хвилин /Georgiades et al., 1984/. А також за допомогою реакції нейтралізації отриманого інтерферону в моноклональними антитілами до препаратів  $\alpha$  і  $\gamma$ -інтерферонів, люб'язно наданих проф. Freundt (Данія).

Вплив  $\gamma$ -інтерферону на показники фагоцитарної активності і бактерицидну активність фагоцитуючих клітин крові свиней визначали загальноприйнятими методиками /Карлов із співавт., 1985; Співак, 1988/.

Антитоксичну активність препаратів гама-інтерферону *in vitro* та *in vivo* визначали за методом Зуєвої із співавт. /1985/.

Визначення антипроліферативної активності препаратів гама-інтерферону проводили шляхом біохімічного аналізу синтезу клітинної ДНК /Малиновская, Литовченко, 1985/.

Результати досліджень обробляли методами статистичної

обробки /Ашмарін із спіавт., 1962/. Результати, що подані графічно, оброблені за допомогою програми Grapher версія 1.75, фірми Golden Software та табличного процесору Quattro Pro версії 4.0 фірми Borland International Inc..

#### *Результати дослідження та їх обговорення*

Отримання будь-якого типу природних інтерферонів, особливо  $\gamma$ , вимагає індивідуального підходу як в підборі клітин-продуцентів, індукторів, методів і умов культивування клітин-продуцентів, так і способів очистки отриманого інтерферону.

Серед усіх клітинних популяцій основними продуцентами  $\gamma$ -інтерферону в спленоцити /Weck et al., 1983/, Т-клітини і природні кілери /Young, Hardy, 1990/. При кооперації цих клітин з макрофагами посилюється синтез  $\gamma$ -інтерферону /Ratlif et al., 1982/. Багато різновидів лімфоцитів і макрофагів має селезінка. Ось чому для отримання клітин-продуцентів  $\gamma$ -інтерферону ми використовували селезінку свиней.

Серед індукторів  $\gamma$ -інтерферону в наш час відома велика кількість як синтетичних, так і природних речовин. Але, незважаючи на це пошук нових індукторів  $\gamma$ -інтерферону продовжується /Young, Hardy, 1990/. Таке становище пов'язано з тим, що більшість нині використаних індукторів  $\gamma$ -інтерферону, не відповідає вимогам, зокрема, медицини. До того ж способи видалення залишків індукторів, доволі дорогі /Kauppinen et al., 1986/.

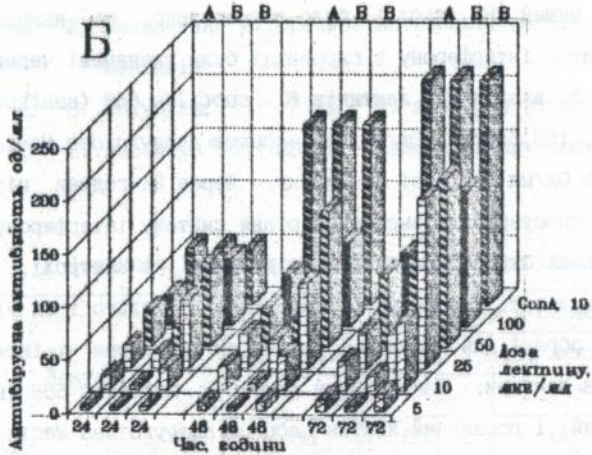
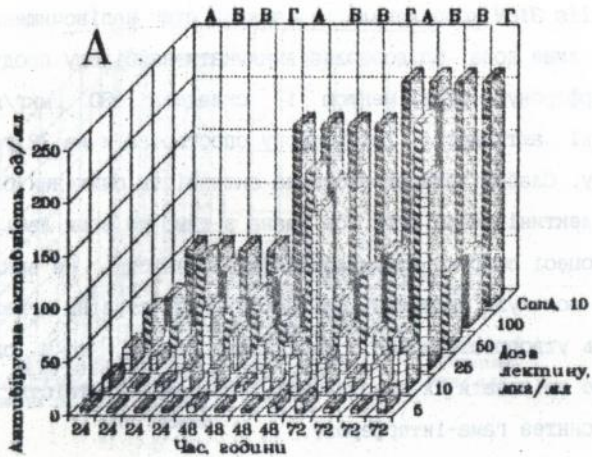
В останній час серйовну увагу вчених викликають лектини бактерій. Вони являють собою поліфункціональні речовини з широким спектром біологічної активності, що приймають участь в процесах обміну речовин і забезпечують взаємодію клітин

між собою і навколишнім середовищем /Підгорський із спіавт., 1992/. Виходячи з цих міркувань, нами було проведено скринінг *in vivo* і *in vitro* серед поаклітинних лектинів спороутворюючих аеробних бактерій роду *Bacillus*, як можливих індукторів  $\gamma$ -інтерферону. Використання цих лектинів як інтерферогенів виявилось вигідним за декількома причинами: простота отримання, нешкідливість для організму як тварини, так і людини.

Як було встановлено (*in vitro*), оптимальними концентраціями лектину *B. subtilis 668 IMB* (напівочищений) для продукції  $\gamma$ -інтерферону були 50 мкг/мл і 100 мкг/мл (мал. 1а). При чому доза в 50 мкг/мл на протязі досліджуваного часу викликала продукцію інтерферону, за кількістю порівнюваного з такою в контролі (Соп А), і складала через 72 години культивування  $213,3 \pm 73,1$  Од/мл. Всі інші бактерійні лектини (напівочищені) виявились більш слабкими інтерферогенами (мал. 1а). Максимальні титри антивірусної активності -  $85,3 \pm 36,9$  Од/мл - *B. subtilis 316M* і  $69,3 \pm 9,2$  Од/мл - *B. полутуха* через 72 години інкубації при дозах 50 мкг/мл і 100 мкг/мл відповідно, що істотно відрізняється від контролю (Соп А).

Лектин із трави "золотий дощ" (*Laburum anagyroides Medik*) *in vitro* також мав певні інтерферогенні властивості (мал.1а). При дозі лектину 25 мкг/мл спостерігали найбільшу продукцію інтерферону -  $180,7 \pm 60,0$  Од /мл.

Очищені лектини *in vitro* (мал.1б) виявились більш слабкими індукторами  $\gamma$ -інтерферону, ніж частково очищені. Серед них найбільшу індукторну здатність мав лектин *B. subtilis 668 IMB* ( $160,0 \pm 18,5$  Од/мл) при використанні в концентраціях 25-50 мкг/мл. Інтерферогенна активність очищеного лектину



Мал. 1. Первинний скринінг напівочищених (а) і очищених (б) лектинів за їх інтерферогенними властивостями

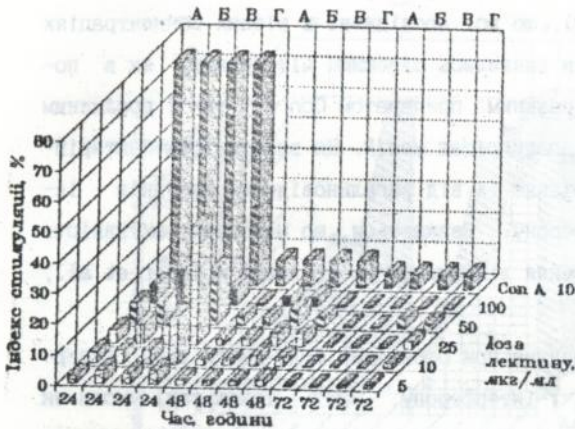
- А - *V. polytuxa*;
- Б - *V. subtilis* 316М;
- В - *V. subtilis* 668 ІМБ;
- Г - *Laburum anagyiodes* Medik;

*B. subtilis* 316M коррелювала з активністю напівочищеного лектину, лише доза, що дозволяє викликати найбільшу продукцію інтерферону, була меншою і складала 30 мкг/мл. Максимальні активності інтерферону спостерігали на 72 год. біосинтезу. Слабка інтерферогенна активність очищених бактерійних лектинів може бути пов'язана з тим, що вони лабільні і в процесі очистки втрачається їх активність. Не виключено, що молекули лектинів, які мають різну ступінь агрегації можуть утворювати моно-, ди- або полімери, що в свою чергу може змінювати їх властивості, зокрема, здатність індукувати синтез гама-інтерферону.

При визначенні інтерферогенної активності лектинів в організмі мишей СВА (табл.1) було встановлено, що найбільш високі титри інтерферону в сироватці були визначені через 4 години після введення у лектинів *B. subtilis* 668 (напівочищений) -  $153,6 \pm 57,2$  Од/мл і *Laburum anagyroides* Medik -  $179,2 \pm 52,6$  Од/мл при дозі 50 мкг/кг. Через 24 години після введення, спостерігали зменшення рівня синтезу інтерферону в досліджуваних сироватках як в досліді, так і в контролі.

В результаті первинного скринінгу *in vitro* і *in vivo* нами були обрані для подальшої роботи як індуктори  $\gamma$ -інтерферону два лектини: бактерійний лектин *B. subtilis* 668 (напівочищений) і рослинний лектин *Laburum anagyroides* Medik.

Однією із властивостей лектинів є стимуляція росту і поділ лімфоцитів, які перебувають у спокої - мітогенна активність. Відомо, що більшість лектинів, які використовуються для індукції гама-інтерферону, є і мітогенами. Досліди, проведені нами по вивченню мітогенних властивостей лектинів бактерій роду *Bacillus* і рослинного лектину "золотий дощ"



Мал. 2. Визначення мітогенної активності напівочищених лектинів

A - *V. polytuxa*;

B - *B. subtilis* 316M;

B - *B. subtilis* 668 IMB; Г - *Laburum anagyrioides* Medik.

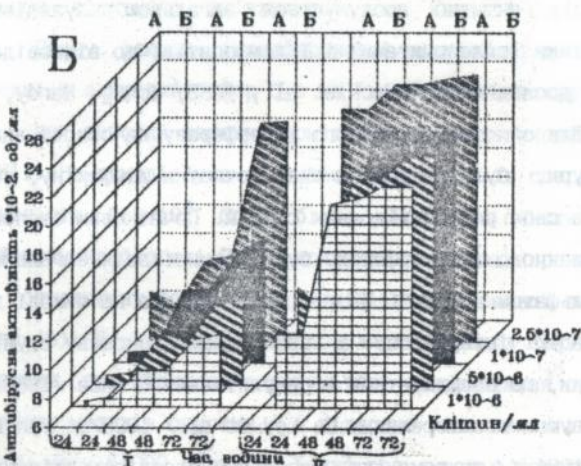
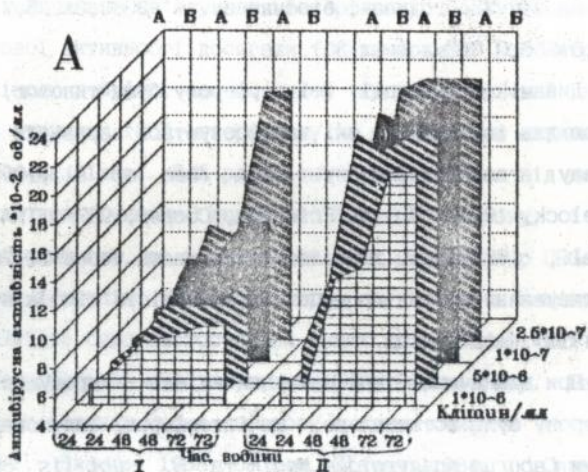
Таблиця 1  
Індукція інтерферону лектинами в організмі мишей СВА

Лектин	Активність інтерферону в сироватці (Од/мл)			
	Час індукції (год) і доза лектину (мкг/кг)			
	4		24	
	50	500	50	500
<i>B. subtilis</i> 668 IMB (напівочищений)	153,6±57,2	76,8±28,6	31,2± 7,2	31,2±7,2
<i>B. subtilis</i> 668 IMB (очищений)	138,7±13,3	69,3± 9,2	21,3± 9,2	20,8±8,7
<i>B. subtilis</i> 316M (напівочищений)	38,4±14,3	51,2±17,5	15,6± 3,8	31,6±7,8
<i>B. subtilis</i> 316M (очищений)	37,3± 4,6	48,2±13,9	13,3± 4,6	26,7 9,2
<i>V. polytuxa</i>	14,0± 4,5	28,8± 7,2	14,8± 2,7	16,8±1,8
<i>Laburum anagyrioides</i> Medik	179,2±70,1	217,6±52,6	48,0±15,0	28,8±8,7
Con A	115,2±28,6	236,8±42,9	59,2±10,7	33,5±3,6

показали, (мал.2), що всі досліджені в різних концентраціях бактерійні лектини виявились слабкими мітогенами, як в порівнянні в контрольним препаратом Con A, так і рослинним лектином *Laburum anagyroides* Medik. Ця властивість бактерійних лектинів відрізняє їх від загальновідомих лектинів - індукторів  $\gamma$ -інтерферону. Вважається, що мітогенна активність лектинів і утворення лімфокинів не зв'язані /Liener et al., 1986/.

Важливе значення при отриманні будь-якого типу інтерферону, зокрема  $\gamma$ -інтерферону, мають також такі умови як праймінг, його час, кількість клітин в біосинтезі, тривалість біосинтезу. Використовуючи індуктор *B. subtilis* 668 IMB (40 мкг/мл), нами були підібрані оптимальні умови для одержання  $\gamma$  - інтерферону (мал.3а). Такими виявились: доза  $\alpha$ -інтерферону для праймінгу - 1000 Од/мл, час праймінгу - 4 години, кількість клітин в біосинтезі -  $1 \times 10^7$  -  $2,5 \times 10^7$  кл/мл і час біосинтезу - 48-72 години. Активність інтерферону, отриманого за такими умовами складала  $2140,8 \pm 235,3$  Од/мл -  $2218,7 \pm 295,7$  Од/мл. До того ж титри інтерферону, отриманого під впливом бактерійного лектину, співпадали з такими ж, отриманими під впливом комерційного препарату Con A.

Подібні досліди по оптимізації продукції  $\gamma$ -інтерферону були проведені і для рослинного лектину *Laburum anagyroides* Medik (25 мкг/мл). В даному випадку оптимальними умовами були: доза  $\alpha$ -інтерферону для праймінгу - 1500 Од/мл, час праймінгу - 4 години, кількість клітин в біосинтезі -  $5 \times 10^6$  -  $2,5 \times 10^7$  кл/мл, час біосинтезу - 24-72 години. Як наслідок, титр інтерферону вже через 24 години культивування складав  $2218,7 \pm 295,7$  Од/мл, з наступним незначним збільшен-



Мал. 3. Вибір оптимальних умов продукції свинячого

$\gamma$ -інтерферону в індукторі напівочищеному бактерійним лектином *B. subtilis* 668 ІМВ (а) і індукторі рослинним лектином *Laburum anagyriodes* Медік (б)

а) А - *B. subtilis* 668 ІМВ; В - Con А.

б) А - *Laburum anagyriodes* Медік; В - Con А.

I - Час праймінгу 2 години; II - Час праймінгу 4 години.

ням на 48-72 годинах біосинтезу - 2389,3±295,7 Од/мл, 2432,0±256,0 Од/мл (мал.36).

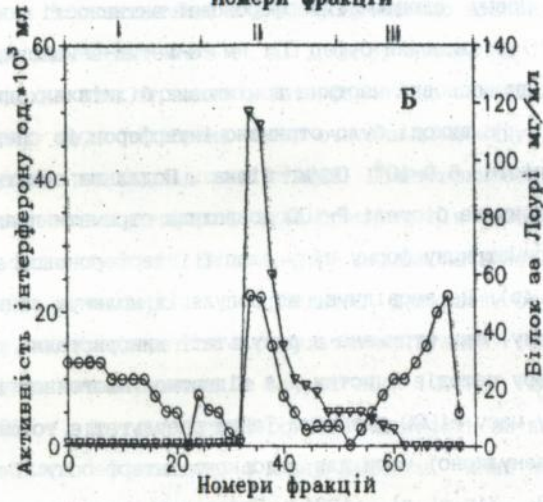
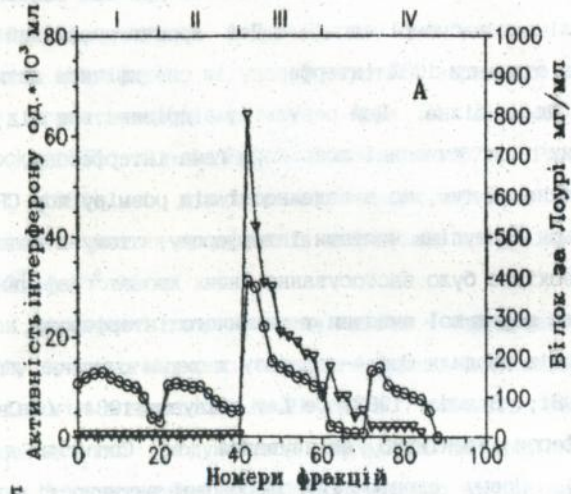
Динаміка продукції  $\gamma$ -інтерферону була типовою, характерною для індукторів, які застосовуються зараз для індукції синтезу гама-інтерферону: CEA /Lee et al., 1990/, ФГА /Wheelock, 1965/, Con A /Friedman, Cooper, 1967/, TPA /Vilcek et al., 1982), і дозволяє отримувати через 24-72 години культивування клітин-продуцентів активність лімфокіну в межах  $1 \times 10^2 - 10^4$  Од/мл.

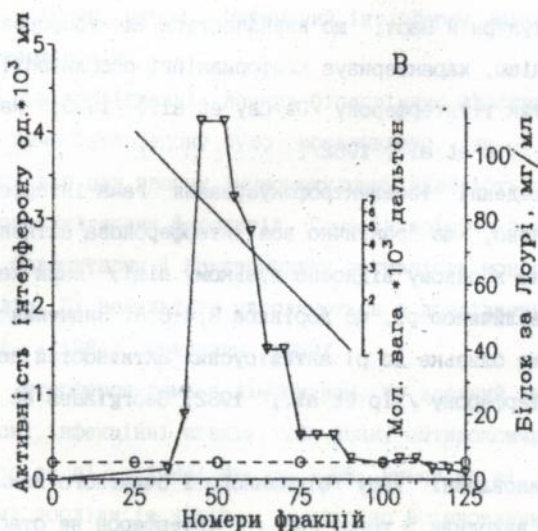
При визначенні типу основних клітин - продуцентів інтерферону було встановлено, що інтерферон, індукований ліктинами *Laburum anagyroides* Medik та *B. subtilis* 668 IMB, найбільш активно продукується загальною популяцією клітин селезінки (спленоцитами) і Т-лімфоцитів, що відповідає даним інших дослідників / Weck et al., 1983; Young, Hardy, 1990/.

Для очистки отриманого інтерферону на основі даних літератури, була підібрана схема очистки лімфокіну, яка включала в себе ряд послідовних стадій. Початковим етапом очистки свинячого  $\gamma$ -інтерферону була преципітація загального білка сульфатом амонію. Ця процедура давала на виході 17% концентрацію інтерферону і приблизно двократну ступінь його очистки, що погоджується з результатами Braude /1983/. Використовуючи спостереження De Ley et al. / 1980/, Van Damme et al. /1981 /, що гама-інтерферон має здатність зв'язуватись з CPG - склом і елююватись з нього буфером, який вміщує сіль високої концентрації і 50% етиленгліколь. Цей хроматографічний засіб дозволив здійснити як очистку, так і концентрування гама-інтерферону. Тому наступним етапом була хроматографія на CPG-склі (мал.4а). При іммобілізації білка на гранули

CPG досягали повне зв'язування інтерферону. Повну елюцію інтерференової активності досягали тільки при 20% концентрації етиленгліколю в буфері елюції. Цей хроматографічний засіб дозволив отримати 100% інтерферону із специфічною активністю  $6,4 \times 10^4$  Од/мг білка. Цей результат відрізняється від даних, отриманих при очищенні людського гама-інтерферону, і може бути пояснений тим, що в залежності від розміру пор CPG-скла змінюється і ступінь чистоти інтерферону, тому в нашому випадку неохідне було застосування інших хроматографічних матриць для подальшої очистки  $\gamma$ -свинячого інтерферону. Багато дослідників вводили Con A-сефарозу в схеми очистки /Yip et al., 1981; Braude, 1983; De Ley, Clayes, 1984; /. Свинячий  $\gamma$ -інтерферон ефективно зв'язувався з Con A-Sepharose (мал.4б). Повну елюцію інтерференової активності досягали при внесенні в елюючий буфер 0,1 М  $\alpha$ -метил-D-манозиду, в той час, як основна частина домішкових білків виходила до цієї стадії. На виході було отримано інтерферон із специфічною активністю  $6,9 \times 10^4$  Од/мг білка. Подальша очистка гама-інтерферону на біогелі P-100 дозволила отримати практично повністю симетричну форму піку елюції інтерференової активності (мал.4в). Це засвідчує, що популяція молекул свинячого  $\gamma$ -інтерферону, яка отримана в результаті використання приведенного набору методів очистки, є відносно гомогенною і має молекулярну масу 51000 дальтон. Такий результат є тотожний з оцінкою молекулярної маси для людського інтерферону /De Ley et al., 1980; Yip et al., 1981/. Всі етапи очистки дозволили збільшити специфічну активність препаратів інтерферону до  $7 \times 10^4$  Од/мг білка.

На останньому етапі очистки - гель-фільтрації на біоге-





Мал. 4. Послідовні стадії очистки свинячого  $\gamma$ -інтерферону хроматографією на склі CPG-10 (а), Con A-сефарозі (б), біогелі Р-100 (в).

○—○ білок за Лоурі; ▽—▽— $\gamma$ -інтерферон.

- а: I - буферний розчин (20 мМ фосфат натрія, рН 7,4 + 0,15 NaCl)  
 II, III, IV - буферний розчин + 5, 20 і 50% етиленгліколю відповідно;  
 б: I - буферний розчин; II - буферний розчин + 0,1М  $\alpha$ -метил-D-маннозид;  
 III - буферний розчин +  $\alpha$ -метил-D-маннозид + 35% етиленгліколю відповідно;  
 в: буферний розчин (0,2 М амоній - ацетат, рН 6,0).

лі Р-100 - кількість білка у фракціях, що містять інтерферонову активність, була нижчою, ніж дозволяє визначити метод Лоурі. Тому про ступінь очистки інтерферону на даній стадії можна було побічно твердити лише за результатами електрофорезу в ПААГ. Співставляючи електрофоретичну рухомість основної забарвленої смуги з рухомістю маркерних білків, можна оцінити молекулярну масу інтерферон-вмісної фракції. В нашому випадку вона виявилась в межах 28000-30000 дальтон. Різ-

ниці в молекулярній масі, що визначається електрофорезом і гель-фільтрацією, характеризує конформаційні особливості нативної молекули  $\gamma$ -інтерферону /De Ley et al., 1980; Nathan et al., 1981; Yip et al., 1982/.

При проведенні ізоелектрофокусування гама-інтерферону було встановлено, що практично вся інтерференова активність сконцентрована в одному відносно вузькому піці, який характеризується величиною  $pI$ , що дорівнює 8,4-8,8. Значення цієї величини, дуже близьке до  $pI$  антивірусних активностей людського гама-інтерферону /Yip et al., 1982; Georgiades et al., 1984/.

При встановленні типу отриманого і очищеного нами інтерферону ми виходили з того, що  $\gamma$ -інтерферон не стабільний при низьких значеннях  $pH$  (2,0-2,5) і до прогрівання при  $56^{\circ}C$  на протязі однієї години, не зберігає і біологічну активність в присутності ДСН /Stewart et al., 1974/. Проведені експерименти засвідчили, що отриманий інтерферон є гама-типу, так як в порівнянні з альфа-інтерфероном він інактивується при  $t-56^{\circ}C$  на протязі 30 хвилин і при зміні  $pH$  до 2,0 він втрачав свою активність. Крім того, відповідно Georgiades et al. /1984/ було проведено дослідження впливу різних хімічних речовин і ферментів на антивірусну здатність  $\gamma$ -інтерферону в порівнянні з альфа-інтерфероном. Гама-інтерферон виявився більш чутливим до іонних детергентів, менш чутливим до впливу неіонних, в порівнянні з  $\alpha$ -інтерфероном. Заключним етапом при встановленні типу отриманого інтерферону була реакція нейтралізації з моноклональними антитілами до  $\alpha$  і  $\gamma$ -інтерферонів. Вона показала, що отриманий інтерферон нейтралізувався моноклональними антитілами до  $\gamma$ -інтерфе-

рону. Таким чином, отриманий інтерферон можна віднести до  $\gamma$ -інтерферонів.

При дослідженні деяких біологічних властивостей свинячого гама-інтерферону було встановлено, що в системі *in vitro* він мав значну імуномодуючу здатність по відношенню до мононуклеарних фагоцитів. Гама-інтерферон значно збільшував фагоцитарну і бактерицидну активність моноцитів і нейтрофілів. Ці результати узгоджуються з дослідженнями Koeffler *et al.* /1984/, Фрейдлин /1989/.

Інтерферон-гама є лімфокіном, що здатний інгібувати невірусні інфекційні агенти, має деяку антиоксидантну активність /Turco *et al.*, 1984; Nakane 1988; Byrne *et al.*, 1989/. Проведені дослідження *in vitro* і *in vivo* по встановленню наявності антиоксидантної дії препаратів свинячого гама-інтерферону показали, що сам інтерферон не має такі властивості. Ця здатність, мабуть, більш властива лімфокінам, що продукуються в процесі інтерферогенезу. Це припущення підтверджується тим, що очищений  $\gamma$ -інтерферон має низьку антиоксидантну активність.

З'ясування особливостей антипроліферативної дії гама-інтерферону на сьогоднішній час детально вивчається, оскільки часто виявляється відповідність цієї дії *in vitro* і *in vivo* /Blalock *et al.*, 1980; Fleischman, 1982/. Дані отримані нами, по вивченню антипроліферативної дії гама-інтерферону свиней показали, що пригнічення синтезу ДНК при внесенні рівних за антивірусною активністю доз інтерферону було більш виразним через 24 години, ніж через 48 годин. До цього терміну чітко виявляли залежність пригнічення реплікації клітинної ДНК від антивірусної активності внесеного интерфе-

рону. Судячи з отриманих результатів і даних літератури /Czarniecki et al., 1984; Криспин із спіавт., 1986; Парфенов із спіавт., 1987/ можна стверджувати, що гама-інтерферон як людини, так і свиней має більш виражений антипроліферативний ефект на одиницю антивірусної активності в порівнянні з альфа-інтерфероном.

Свинячий гама-інтерферон ефективно захищав гомологічні клітини СПЕВ та ПСП від дії вірусу везикулярного стоматиту, в меншій мірі клітини людини - L-41 (70,2±13,7 %) та клітини бика - MDBK (46,3±9,8%).

Таким чином, отриманий свинячий гама-інтерферон за деякими фізико-хімічними, біологічними властивостями та механізмом дії є близьким до людського гама-інтерферону.

#### ВИСНОВКИ

1. Підібрано нові ефективні індуктори для біосинтезу гама-інтерферону свиней - бактерійний лектин *Bacillus subtilis* 668 IMB та рослинний лектин *Laburum anagyroides* Medik, цим індукторам властиві слабкі мітогенні потенції.

2. Згідно з розробленими оптимальними умовами праймінгу і біосинтезу було отримано гама-інтерферон свиней, властивості якого було досліджено в різноманітних експериментах.

3. Розроблена ефективна схема очистки отриманого інтерферону, встановлена його молекулярна маса, яка складає 28000-30000 Д, та визначена ізоелектрична точка (8,4-8,8).

4. Встановлено, що гама-інтерферон в системі *in vitro* і *in vivo* має слабку антиоксидантну дію.

5. Препарати свинячого гама-інтерферону виявляють модулюючу дію на поглинальну і бактерицидну активність фагоцитів крові свиней *in vitro*, збільшуючи їх показники більш як уд-

віці та проявляють високу антипроліферативну активність.

6. Свинячий гама-інтерферон ефективно захищав гомологічні клітини СПЕВ та ПСП від дії вірусу везикулярного стоматиту, в меншій мірі клітини людини - L-41 (70,2±13,7 %) та клітини бика - MDBK (46,3±9,8%).

7. Отримані дані дозволили створити нормативно-технічну документацію і застосування на виробництво свинячого гама-інтерферону, яка після затвердження в установленому порядку передана для промислового випуску препарату на Ладизинське ВВФУ "Ензим" та Управлінню ветеринарної медицини України - для використання в ветеринарній практиці.

*Перелік робіт, опублікованих за матеріалами дисертації*

1. Иваненко В.К., Жолобак Н.М., Фильчаков И.В. Изучение антитоксической активности, продуцирующейся в процессе интерфероногенеза. // Научно практическое - совещание "Вирусология народному хозяйству" (Киев, апрель 1987 г.): Тев. докл. - Киев: КГУ, 1987. - С.28.

2. Spivak N.Ya., Ivanenko V.K., Kovalenko E.A. Study of interferonogenic activity of bacterial lectins // In: Abstracts INTERLEC - 11, 11-th International Lectin Conference, Tartu university, Estonian Academy of Sciences, June 4-9, 1989. - P.67.

3. Иваненко В.К., Карпов А.В., Спивак Н.Я., Кишко Я.Г. Сравнительная характеристика препаратов свиных альфа и гамма - интерферонов" // Всесоюзный семинар "Использование интерферонов в ветеринарии" (Киев, октябрь 1989 г.): Тев. докл. - Киев: 1989. - С.10-11.

4. Ivanenko V.K., Karpov A.V., Grabchenko N.I. et al. The induction of  $\gamma$  - interferon by bacterial lectins // In:

Abstracts 8 - th International Congress of Virology, Berlin: 1990. - P. 339.

5. Kishko Ya.G., Ivanenko V.K. The perspective of interferon preparations using for prophylaxis and treatment of virus diseases in agricultural animals //In: Abstracts 8-th International Congress of Virology, Berlin: 1990. - P. 340.

6. Иваненко В.К., Коваленко Э.А., Варбанец Л.Д. и др. Бактериальные гликопротеины - новые, перспективные индукторы интерферона //Современные аспекты применения интерферонов и других иммуномодуляторов (сборник научных трудов), Москва: 1990. - С. 44.

7. Kovalenko E.A., Simonenko I.A., Getman E.I., Spivak N.Ya., Ivanenko V.K., Skripal I.G., Podgorsky V.S. Isolation, properties and some application aspects of extracellular lectins of spore - forming aerobic bacteria //In: Abstracts 6-th Europ. Sympos. on Carbohydrate chemistry, Edinburgh, Scotland, 8-13 Sept., 1991. - P. 65.

8. Карпов А.В., Иваненко В.К., Кишко Я.Г. и др. Получение и очистка свиного гамма-интерферона //Вопросы вирусологии - 1993.- 36, №2. - С.78-81.

9. А. с. N 1561273 СССР МКИ А 61 К 37/66. Способ получения гамма-интерферона сельскохозяйственных животных / Кишко Я.Г., Спивак Н.Я., Назарук М.И., Иваненко В.К. и др. - 13.01.88, ДСП N 390.

10. А.с. N 1645093 СССР МКИ А 61 К 37/66, 35/50. Способ получения интерферона /Кишко Я.Г., Спивак Н.Я., Карась О.Я., Иваненко В.К. и др. ДСП N 286.

11. Индуктор гамма-интерферона. Положительное решение от

20.01.92, N4935373 / Кишко Я.Г., Иваненко В.К., Лаворенко Л.В., Подгорский В.С., Коваленко Э.А., Симоненко И.А., Гетьман Е.

12. Спосіб виготовлення гама-анімаферонів та пристрій для його здійснення. Позитивне рішення Держпатенту України від 10.03.1994р., N94030717 /Кишко Я.Г., Иваненко В.К., Думанський В.Д., Селевньов О.В.

13. Кишко Я.Г., Иваненко В.К., Коваленко Э.А., Подгорский В.С. /ТУ 15-9. 1/15 "Гамма-суиферон". Утв. Главным Управлением ветеринарии Украины 23 апреля 1992 г.

Иваненко В.К. "Разработка способа получения свиного гама-интерферона и изучение его некоторых физико-химических и биологических свойств".

Рукопись диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.06-вирусология.

Защита состоится в Институте микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев, 1994.

Разработан способ получения свиного гама - интерферона ( $\gamma$ -ИФН) с помощью новых индукторов - бактериального и растительного лектинов. Были подобраны оптимальные условия его продукции. Физико-химические исследования свиного  $\gamma$ -ИФН показали, что он является гликопротеином с изoeлектрической точкой 8.4-8.8, молекулярной массой 28000-30000. Разработана схема очистки лимфокина, включавшая в себя преципитацию сульфатом аммония и хроматографию на CPG-стекле, Sep A-Sepharose и биогеле P-100. Эти методы очистки позволили получить  $\gamma$ -ИФН со специфической активностью  $7 \cdot 10^4$  Ед/мг белка. Полученный препарат обладал антивирусным, антипролифера-

ТИВНЫМ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИМИ СВОЙСТВАМИ.

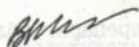
Ivanenko V.K. "The development of the method for pigs gamma-interferone obtaining and studying of its physico-chemical and biological characteristics".

The manuscript of dissertation is presented for competition of scientific degree of philosophy doctor in accordance with the speciality - 03.00.06., Virology.

The public discuss of the main results dissertation will be in the Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine, Kiev, 1994.

The obtaining method of the pigs gamma-interferone ( $\gamma$ -IFN) is carried out using modern immunomodulators - bacterial and plant's lectins. The optimal conditions of its productionn have been devised. The data of physico-chemical studying the pigs  $\gamma$ -IFN are demonstrated the late is the glycoprotein with an isoelectric points around 8,4-8,8 and molecular weight from 28000 to 30000. The scheme of limfokine purification including the precipitation by ammonium sulphate and chromatographic separation on CPG-glass, Con-A-Sepharose and biogel P-100 was carried out. These purification methods have been resulted the  $\gamma$ -IFN with the specific activity around of  $7 \cdot 10^4$  units per mg of protein. The obtaining preparation of  $\gamma$ -IFN possessed an antiviral, antiproliferative and immunomodulation effects.

Ключові слова: гама - інтерферон, лектини, біосинтез, очистка, біологічні властивості.



Підписано до друку 06.10.94р формат 60x84/16

Папір друк. Умов. друк. л. 1,0. Тираж 100 примірник. Заказ №1402

---

Надруковано ЦУОП ДНП "Плодвинконсерв" м. Київ, Саксаганського , 1

15850

AB 31.232

**AB 31.232**