

УДК 619:578.245

Костюк Н.И., кандидат ветеринарных наук, доцент

Кулешова Ю.М., кандидат биологических наук, доцент

Острикова К.В., магистр биологических наук

Потапович М.И., заведующий НИЛ биотехнологии кафедры микробиологии биологического факультета БГУ

Прокулевич В.А., доктор биологических наук, профессор

Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

ОЦЕНКА ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ БЫЧЬИХ РЕКОМБИНАНТНЫХ ИНТЕРФЕРОНОВ *IN VITRO*

Резюме

При лечении и профилактике вирусных инфекций сельскохозяйственных животных активно применяются рекомбинантные интерфероны. Одним из важнейших показателей качества, отражающих эффективность и безопасность препаратов на основе интерферонов, является специфическая противовирусная активность. С помощью биологического метода дана сравнительная характеристика величины специфической активности бычьих интерферонов различных типов, а также их композиций, на перевиваемой клеточной культуре MDBK. Показано наличие выраженной специфической противовирусной активности композиций интерферонов.

Ключевые слова: противовирусная активность, рекомбинантные белки, бычьи интерфероны альфа (α), лямбда (λ), гамма (γ), тау (τ), линия клеток MDBK.

Summary

Recombinant interferons are actively used in the treatment and prevention of viral diseases in farm animals. One of the most important quality indicators reflecting the effectiveness and safety of interferon preparations is specific antiviral activity. A biological method was used to determine the activity of interferons. The estimation of the specific activity of interferons on the MDBK cell line was studied. The presence of specific antiviral activity of interferon compositions has been shown.

Keywords: antiviral activity, recombinant proteins, bovine interferons alpha (α), lambda (λ), gamma (γ), tau (τ), MDBK cell line.

Поступила в редакцию 02.12.2025 г.

ВВЕДЕНИЕ

Высокий уровень заболеваний инфекционного характера у животных, наряду с недостаточной эффективностью в ряде случаев известных ветеринарных препаратов, требует разработки новых средств профилактики и лечения. Особенно это касается борьбы с вирусными инфекциями. В основе таких разработок могут быть использованы субстанции с выраженной антивирусной активностью, модуляторы клеточного и/или гуморального иммунитета [1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 12]. Таким широким спектром действия обладают белки млекопитающих, получившие групповое наименование цитокины, в частности группа полифункциональных сигнальных молекул – интерферонов I, II и III типа. С развитием генноинженерной методологии и биотехнологических производств появилась возможность получать индивидуальные белки в различных

системах экспрессии в промышленных масштабах, в том числе и молекулы, входящие в пул естественных видоспецифических модуляторов на уровне регуляции генов иммунной системы организма животных. Получение рекомбинантных регуляторных «защитных» белков является актуальной проблемой для развивающейся современной медицины и ветеринарии [2, 3, 8, 9, 10, 12, 13].

Результаты экспериментальных исследований и клинический опыт показывают, что разработка действенных и безопасных средств противoinфекционной терапии, а также методов их применения может в корне изменить тактические схемы как профилактики, так и лечения животных и тем самым повысить экономическую эффективность промышленного животноводства [5, 6, 8, 10, 12, 14, 15].

Рекомбинантные интерфероны с высокой противоинойфекционной активностью все чаще рассматриваются как основные действующие вещества при разработке перспективных фармацевтических препаратов ветеринарной противоинойфекционной иммунотерапии [5, 10, 11, 12, 13, 14, 15].

Цель исследования – изучить противовирусную активность рекомбинантных бычьих интерферонов (ИФН) различных типов и их композиций: альфа (α) + тау (τ) (ИФН I типа); альфа (α) + лямбда (λ) (ИФН I + ИФН III типов); альфа (α) + гамма (γ) + лямбда (λ) (ИФН I + ИФН II + ИФН III типов); тау (τ) + гамма (γ) (ИФН I + ИФН II типов); тау (τ) + лямбда (λ) (ИФН I + ИФН III типов); тау (τ) + гамма (γ) + лямбда (λ) (ИФН I + ИФН II + ИФН III типов); гамма (γ) + лямбда (λ) (ИФН II + ИФН III типов) с использованием тест-системы на основе перевиваемой культуры клеток MDBK *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Противовирусную активность композиций интерферонов определяли путем сравнения противовирусной активности испытуемых субстанций с аналогичным показателем стандартного образца интерферона на модели перевиваемой клеточной линии MDBK.

Культивирование клеточных линий осуществляли согласно паспортным рекомендациям производителя. Перед работой с перевиваемыми клеточными линиями проводили макро- и микроскопический анализ монослоя. В работу брали культуральные флаконы со 100%-ным монослоем клеток с эпителиоподобной морфологией, типичной для данной линии, не содержащие посторонних агентов.

Клетки снимали с субстрата по общепринятой методике [7]. Из полученной клеточной суспензии отбирали пробу в объеме 0,01 см³ для определения количества и жизнеспособности клеток тестом, основанным на нарушении мембранной целостности, измеряемой по проникновению красителя трипанового синего [7]. Количество клеток подсчитывали с помощью электронного счетчика Countess II («Life Technologies», США).

В исследовании использовали индикаторный вирус везикулярного стоматита

(VSV) с титром 10⁵ ТЦД/см³. За титр (активность) вируса принимали наибольшее разведение вируса, при котором клеточный монослой в 50 % лунок оказался полностью пораженным цитопатическим действием. Титр вируса выражали в тканевых цитопатических дозах ТЦД₅₀/мл.

Определение специфической активности ИФН и их композиций проводили следующим образом: готовили серии двукратных разведений ИФН в питательной среде ДМЕМ с содержанием 2 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) в разведениях от 1:100 до 1:12800. Из лунок планшетов со сформировавшимся полноценным клеточным монослоем удаляли ростовую питательную среду (ДМЕМ с содержанием 10 % ЭТС) и вносили приготовленные разведения интерферонов. На каждое разведение использовали по 4 лунки с культурой клеток МДВК. Для контроля клеточного монослоя (КК) на планшете оставляли не менее 4 лунок и не менее 16 лунок – для контроля дозы вируса. Планшеты инкубировали в СО₂-инкубаторе в течение 24–48 ч при температуре (37±1) °С в атмосфере с (5,0±0,5) % СО₂. После инкубирования из планшета удаляли среду и во все лунки, содержащие отдельные ИФН, композиции ИФН и стандартный ИФН, вносили индикаторный VSV в рабочей дозе 100,0 ТЦД₅₀/0,1 см³. В лунки, предназначенные для контроля дозы вируса, вносили разведения вируса, соответствующего 100,0 ТЦД₅₀/0,1 см³; 10,0 ТЦД₅₀/0,1 см³; 1,0 ТЦД₅₀/0,1 см³; 0,1 ТЦД₅₀/0,1 см³. В лунки, предназначенные для контроля клеточного монослоя, вносили поддерживающую среду (ДМЕМ с содержанием 2 % ЭТС). После внесения вируса 96-луночные планшеты помещали в СО₂-инкубатор на 24–48 ч до появления цитопатического действия в монослое клеток.

Учет результатов проводили методом визуальной оценки монослоя с помощью инвертированного микроскопа Nikon TS100 («Nikon Corporation», Япония). Для разведений стандарта ИФН и испытуемых образцов определяли количество лунок, в которых наблюдалось цитопатическое действие вируса. Для каждого планшета рассчитывали титр стандартного (Т_{СО}) и испытуемого образцов (Т_{ИР}) методом Спирмена-Кербера (формулы 1–3):

$$T_{ИФН} = 2^{\log_2 ED_{50ИФН}}, \quad (1)$$

$$T_{COH} = 2^{\log_2 ED_{50COH}}, \quad (2)$$

$$\log_2 ED_{50} = D_{max} + \frac{d}{n} \times (p - \frac{n}{2}), \quad (3)$$

где $\log_2 ED_{50}$ – двоичный логарифм титра стандартного или испытуемого образцов;

D_{max} – двоичный логарифм разведения, ниже которого наблюдается защита клеток от вируса, т.е. отсутствие признаков деградации монослоя, в 100 % лунок;

d – двоичный логарифм шага разведений, равный 1;

n – число лунок, приходящееся на каждое разведение;

p – число лунок для разведения, соответствующего D_{max} , и последующих разведений, в которых отсутствует цитопатическое действие вируса.

За титр ИФН принимали величину, обратную разведению образцов, при котором клеточная культура в 50 % лунок полностью защищена от ТЦД вируса.

Специфическую активность испытуемых образцов ($A_{ИФН}$) рассчитывали по формуле 4:

$$A_{ИФН} = A_{COH} \times \frac{T_{ИФН}}{T_{COH}}, \quad (4)$$

где A_{CO} – специфическая активность стандартного образца;

$T_{ИФН}$ – титр испытуемого образца;

T_{CO} – титр стандартного образца;

n – число лунок, приходящееся на каждое разведение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате проведенной работы определена противовирусная активность рекомбинантных бычьих ИФН α , γ , λ , τ и их композиций: $\alpha + \tau$; $\alpha + \lambda$; $\alpha + \gamma + \lambda$; $\tau + \gamma$; $\tau + \lambda$; $\tau + \gamma + \lambda$; $\gamma + \lambda$, представленных в виде белковых субстанций высокой степени очистки ($\geq 98\%$).

Каждый экспериментальный образец представлял собой стерильный раствор рекомбинантных бычьих интерферонов в Трис-буфере (50 мМоль Трис-НCl, pH 7,0–8,0, 20 мМоль NaCl, 1 мМоль ЭДТА). При

создании композиций бычьих ИФН различных типов смешивали в соотношении 1:1, при этом общая концентрацией белка в композиции составляла 15 мкг/см³.

В ходе исследований активности отдельных ИФН и их композиций в модельной системе с использованием перевиваемой культуры клеток MDBK установлена выраженная противовирусная активность всех изучаемых образцов (таблицы 1, 2).

Полученные данные свидетельствуют, что композиции ИФН способны нейтрализовать цитопатическое действие VSV на 50 % в концентрациях, близких к таковым для стандартного образца ИФН.

Исходя из данных, представленных в таблице 1, можно заключить, что образцы ИФН различных типов обладали противовирусной активностью и подавляли цитопатическое действие индикаторного вируса в условиях *in vitro*, при этом наибольшие разведения исследуемых ИФН не защищали клетки от вируса. ИФН- α подавлял цитопатическое действие вируса на 50 % в разведениях до 1:3200, что соответствует противовирусной активности $3,2 \times 10^6$ МЕ/мг. Бычий ИФН- τ подавлял действие вируса на 50 % в разведениях до 1:400, его активность составила $0,4 \times 10^6$ МЕ/мг; ИФН- γ – $0,6 \times 10^6$ МЕ/мг, ИФН- λ – $1,6 \times 10^6$ МЕ/мг соответственно. Таким образом, проведенные исследования показали, что интерфероны α и λ обладали более выраженной противовирусной активностью, чем τ и γ , в системе перевиваемой линии клеток MDBK.

Следует отметить, что бычьи рекомбинантные интерфероны I (α) и III (λ) типов проявили наиболее высокую степень антивирусной активности, сопоставимую со стандартным образцом. Эти типы ИФН по своим структурно-функциональным свойствам отнесены к противовирусным цитокинам, имеющим свои рецепторы узнавания на поверхности клеток. Интерфероны γ и τ продемонстрировали пониженную противовирусную активность, что может быть следствием того, что главные функции ИФН- γ (II тип) заключаются в контроле клеточного и гуморального иммунного процесса, а ИФН- τ участвует в процессе распознавания беременности у жвачных животных.

Таблица 1 – Определение противовирусной активности бычьих рекомбинантных ИФН на перевиваемой линии клеток MDBK

Разведения ИФН*	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800
Бычий α -ИФН	-	-	-	-	+	++	++++	++++
Бычий τ -ИФН	-	-	++	+++	+++	++++	+++	++++
Бычий γ -ИФН	-	-	+	+++	++++	++++	++++	++++
Бычий λ -ИФН	-	-	-	-	++	+++	+++	++++
Стандартный образец ИФН**	-	-	-	-	+	++	+++	+++

Примечания:

* – за 1 часть ИФН принималась концентрация 1,0 мкг/см³;

** – коммерческий препарат рекомбинантного α -ИФН («PBL InterferonSource», США);

++++ – полный цитопатический эффект, дегенерация клеток 80–100 %;

+++ – сохраняются участки монослоя без дегенерации, около 25 % всей площади;

++ – монослой частично сохранен, 50 % живых клеток;

+

– отсутствие признаков дегенерации, 100%-ный монослой, защита клеток от вируса

Таблица 2 – Противовирусная активность композиций бычьих рекомбинантных ИФН *in vitro* на перевиваемой культуре клеток MDBK

Разведения ИФН*	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800
А) $\alpha + \tau$	-	-	++	++	+++	+++	++++	++++
Б) $\alpha + \lambda$	-	-	-	++	++	++	+++	++++
В) $\alpha + \gamma + \lambda$	-	-	-	-	+	++	++	+++
Г) $\tau + \gamma$	-	-	+	++	++	+++	++++	++++
Д) $\tau + \lambda$	-	-	-	+	++	++	+++	+++
Е) $\tau + \gamma + \lambda$	-	-	+	++	++	+++	++++	++++
Ж) $\gamma + \lambda$	-	-	+	++	++	++++	+++	++++
Стандартный образец ИФН**	-	-	-	-	+	++	+++	+++

Примечания:

* – перед титрованием в планшет общую концентрацию белка в образцах доводили до 1,0 мкг/см³;

** – коммерческий препарат рекомбинантного ИФН- α («PBL InterferonSource», США) в концентрации 1,0 мкг/см³;

++++ – полный цитопатический эффект, дегенерация клеток 80–100 %;

+++ – сохраняются участки монослоя без дегенерации, около 25 % всей площади;

++ – монослой частично сохранен, 50 % клеток живых;

+

– отсутствие признаков дегенерации, 100%-ный монослой

Сходную со стандартным образцом противовирусную активность проявили композиции Б ($\alpha + \lambda$) и Д ($\tau + \lambda$) – $3,2 \times 10^6$ МЕ/мг. При этом композиция В ($\alpha + \gamma + \lambda$) проявляла наиболее выраженную ан-

тивирусную активность в разведениях более высоких, чем стандартный образец, – 1:6400, что соответствует $6,4 \times 10^6$ МЕ/мг (рисунок).

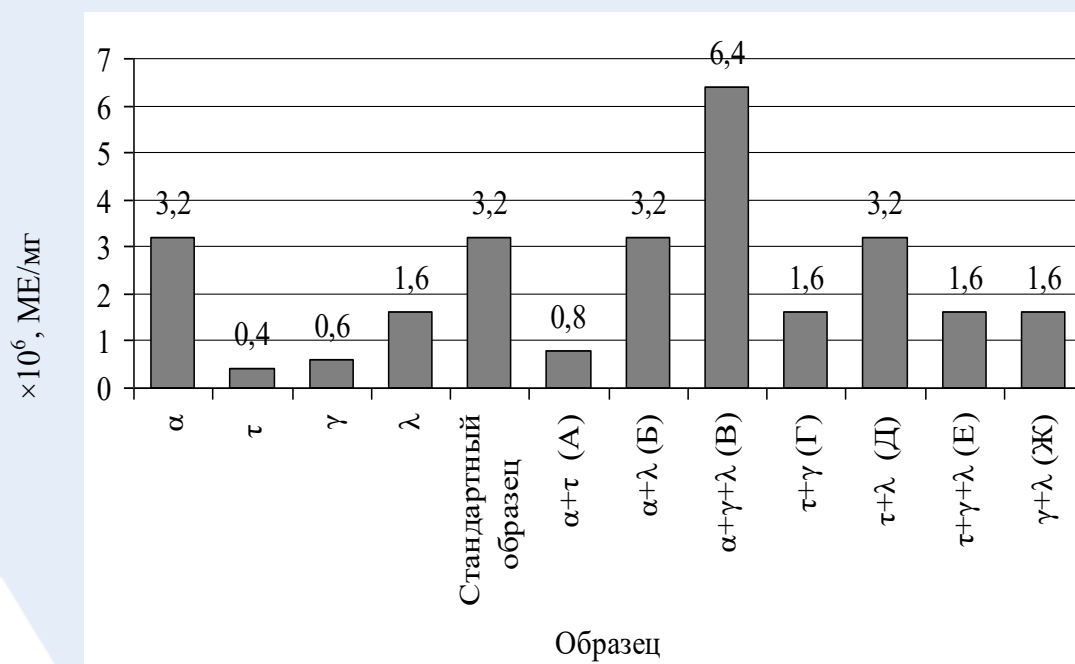


Рисунок – Сравнительная характеристика противовирусной активности композиций бычьих рекомбинантных ИФН *in vitro* в тест-системе перевиваемой культуры клеток MDBK

Композиция А ($\alpha + \tau$) показала самую низкую противовирусную активность в тест-системе перевиваемой культуры клеток MDBK. Это может быть связано как с конкуренцией данных видов ИФН за рецепторы, поскольку они относятся к одному типу (I тип), так и с возможной несовместимостью ИФН в составе одной композиции и, как следствие, со снижением активности.

Представленные на рисунке результаты демонстрируют, что практически все составленные композиции обладают более выраженной противовирусной активностью по сравнению с отдельно взятыми рекомбинантными ИФН.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованные рекомбинантные ИФН и их композиции обладают выраженной противовирусной активностью в тест-системе перевиваемой культуры клеток MDBK, что позволяет прогнозировать их

перспективность для применения в качестве основы лечебно-профилактических ветеринарных препаратов.

Проведенные исследования показали, что композиции ИФН вызывают снижение ТЦД на 50 % при разведениях от 1:1600 до 1:3200. При этом композиция В ($\alpha + \gamma + \lambda$) сохраняет высокий уровень противовирусной активности даже в разведениях 1:6400, что эффективнее противовирусного действия стандартного образца. Сравнительная характеристика антивирусной активности рекомбинантных ИФН, проведенная в условиях *in vitro*, показала, что композиции $\alpha + \lambda$ (вариант Б) и $\alpha + \gamma + \lambda$ (вариант В) более эффективны в подавлении цитопатического действия индикаторного вируса на клеточной линии MDBK, чем $\tau + \gamma$ (вариант Г), $\tau + \lambda$ (вариант Д), $\tau + \gamma + \lambda$ (вариант Е), $\gamma + \lambda$ (вариант Ж), а самая низкая противовирусная активность установлена у композиции $\alpha + \tau$ (вариант А).

Полученные в исследовании данные демонстрируют, что как отдельные интерфероны, так и их композиции могут являться эффективным средством противодей-

ствия вирусным инфекциям и потенциально могут быть рассмотрены для использования в клинической практике при лечении вирусных заболеваний.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Беликов, В. Г. Фармацевтическая химия / В. Г. Беликов. – М. : Высшая школа, 1993. – С. 192–198.
2. Власов, Н. А. Антибиотики и химиопрепараты для борьбы с инфекционными болезнями животных / Н. А. Власов, Д. А. Васильев // Новые методы в профилактике и лечении инфекционных болезней. – 1997. – № 1. – С. 22–24.
3. Волкова, М. А. Интерферон-α в терапии онкогематологических заболеваний / М. А. Волкова // Вместе против рака. – 2005. – № 1. – С. 38–51.
4. Глотов, А. В. Особенности проявления вирусных и ассоциативных вирусно-бактериальных болезней крупного рогатого скота / А. В. Глотов // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2009. – № 2. – С. 17–27.
5. Григорян, А. А. Схемы применения миксоферона при лечении телят / А. А. Григорян, В. Н. Прохоров // Ветеринария. – 1996. – № 2. – С. 9–11.
6. Гуревич, Г. И. Профилактика сезонных острых респираторных вирусных инфекций / Г. И. Гуревич // Биомедицинский журнал. – 2001. – № 10. – С. 42–45.
7. Дьяконов, Л. П. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) / Л. П. Дьяконов. – М. : Спутник, 2009. – 656 с.
8. Еришов, Ф. И. Система интерферона в норме и патологии / Ф. И. Еришов. – М. : Медицина, 1996. – С. 12–68.
9. Конопаткин, А. А. Диагностика моно- и смешанных респираторных инфекций крупного рогатого скота / А. А. Конопаткин // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2000. – № 1. – С. 9–20.
10. Муравьев, И. А. Технология лекарств / И. А. Муравьев. – М. : Медицина, 1980. – Т. 2. – С. 538–553.
11. Попов, В. Ф. Лекарственные формы интерферонов / В. Ф. Попов. – М. : Триада-Х, 2002. – С. 21–27.
12. Прокулевич, А. В. Ветеринарные препараты на основе интерферона / В. А. Прокулевич, М. И. Потапович // Вестник Белорусского государственного университета. – Сер. 2. Химия. Биология. География. – 2011. – № 3. – С. 51–55.
13. Рафальский, В. В. Клиническое применение препаратов интерферона / В. В. Рафальский. – Смоленск : Смоленская государственная медицинская академия, 1997. – 233 с.
14. Brujeni, N. Cloning and high level expression of bovine interferon gamma gene in eukaryotic cells / N. Brujeni, H. Tadjbakhsh // Iranian Journal of Veterinary Research. – 2010. – Vol. 11, № 2. – P. 125–133.
15. Costa-Pereira, A. P. The antiviral response to gamma interferon / A. P. Costa-Pereira, T. M. Williams, B. Strobl // J. of Virology. – 2002. – Vol. 76. – P. 9060–9068.

наша продукция

