УДК 578.245:577.1113.7:57.086.833

Ю. Пенчук, ас., О. Карпов, д-р біол. наук,
З. Ульберг, д-р хім. наук, О. Молчанець, канд. біол. наук

ТЕХНОЛОГІЧНІ ПАРАМЕТРИ КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН-ПРОДУЦЕНТІВ ІНТЕРФЕРОНУ В ДОСЛІДНІЙ УСТАНОВЦІ З ВИКОРИСТАННЯМ ІМОБІЛІЗОВАНОГО ІНДУКТОРУ

В дослідах визначені оптимальні значення початкових концентрацій клітин-продуцентів та вмісту сироватки великої рогатої худоби при культивуванні клітин-продуцентів інтерферону в дослідному біореакторі з застосуванням гранульованого імобілізованого індуктору інтерфероногенезу (ІММК). Отримані дані можуть бути використані при впровадженні технології виробництва інтерферонів І типу природного походження з застосуванням ІММК в фармацевтичній промисловості.

The experiments have shown the optimal parameters of initial producing cell concentration and the content of bovie serum necessary for interferon producing cell cultivation in an experimental bioreactor using a granulated immobilized interferonogenesis inducer (IMMC). The data obtained may be useful for introduction of natural type I interferons production using IMMC in pharmaceutical industry.

Вступ. У зв'язку з широким використанням в сучасній лікарській практиці препаратів інтерферонів (ІФН) природного походження досить актуальним є вдосконалення технології їх отримання в умовах крупномасштабного виробництва. Ефективність цього процесу обумовлює вдало підібране поєднане використання тих чи інших клітин-продуцентів, а також ефективного індуктору інтерфероногенезу. При цьому надзвичайно великого значення набуває дослідне визначення і подальше дотримання оптимальних фізіологічних параметрів культивування клітин-продуцентів в конкретних умовах застосованого біореактору,

Раніш для промислового отримання препаратів ІФН І типу нами був запропонований принципово новий індуктор багаторазового використання – молекулярний комплекс дріжджова РНК-гідрохлорид тилорону, імобілізований на гранулах Сферону (ІММК) [1]. З метою відпрацювання технології отримання у культурах еукаріотичних клітин препаратів ІФН з використанням ІММК нами була сконструйована і випробувана спеціальна дослідна установка, як прототип апаратури для отримання ІФН у виробничих умовах. Була доведена ефективність цієї установки щодо підтримання життєздатності культивованих в ній клітин-продуцентів різного типу, а також підвищена продуктивність синтезу ІФН, у порівнянні зі стаціонарними умовами [2]. Мету даної роботи склало встановлення ряду важливих технологічних параметрів культивування клітин моношарових та суспензійної культур в установці при використанні ІММК, а саме: 1) оптимальної початкової концентрації клітин-продуцентів для ємностей, що використовуються в установці і 2) оптимального вмісту сироватки великої рогатої худоби (ВРХ) для культивування клітин.

Матеріали і методи. Досліди проводили на перещепленій лінії клітин тестикулів поросят (ПТП) (НДІ ветеринарії НАСГН України, Київ) (моношарові культури), а також на первинній культурі мононуклеарних клітин крові людини (суспензійна культура). Культивування клітин здійснювали, як описано раніш [1]. При вирощуванні клітин використовували сироватки великої рогатої худоби виробництва НВП "Біо-Тест-Лабораторія", Україна.

Інтерфероногенний молекулярний комплекс(ІММК) являв собою конструкцію на основі гранул Сферо ну 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 [1, 2].

В основі дії дослідної установки для культивування клітин-продуцентів був покладений принцип ролерного перемішування горизонтально закріплених ємностей для культивування. Установка конструювалася як універсальна, в розумінні можливості культивувати як моношарові, так і суспензійні культури. Використовувався циклічний спосіб організації культивування клітин. Опис та схема дослідної установки наведені раніш [2].

Кількість живих клітин у зразках визначали методом виключення барвника живими клітинами при фарбуванні 0,1% розчином трипанового синього в ізотонічному розчині NaCl згідно стандартної методики [3]. Титрування ІФН у зразках проводили згідно стандартної методики [4], використовуючи у якості тест-вірусу вірус везикулярного стоматиту штам Індіана у дозі 100 $ТЦД_{50}$.

Результати та їх обговорення. Однією з головних задач при розробці біотехнологічних систем культивування клітин ссавців є забезпечення життєдіяльності клітинної популяції *in vitro*, тобто створення необхідних фізичних і хімічних умов оточуючого середовища, що відповідають фізіологічним потребам культури [5]. До найбільш суттєвих факторів ефективного культивування клітин-продуцентів відноситься оптимальна для конкретних дослідних умов початкова концентрація клітин в ємностях біореактору.

Для культивування клітин ми використовували культиватор роллерного типу, принцип роботи якого полягав в обертанні розташованих горизонтально ємностей з моноцитами крові людини, що мають здатність до росту і синтезу ІФН при знаходженні в монодисперсному стані в культуральній суспензії; при культивуванні моношарових культур внутрішня поверхня вказаних ємностей слугувала ростовою поверхнею клітинам. При цьому в обох зазначених випадках важливим було забезпечити контакт якомога більшої кількості клітин з ІММК для подальшої продукції ними ІФН; все це відбувалося у фіксованому об'ємі, який займало живильне середовище у культуральній ємності (у наших дослідних умовах вказаний об'єм складав 15 $см^3$, внутрішня поверхня ємності дорівнювала 28 $см^2$, коефіцієнт заповнення – 0,7). Тому правильний підбор початкової концентрації клітин-продуцентів в ємностях у даному випадку відігравав досить важливу роль в ефективному використанні апаратури для отримання цільового продукту.

Дані експериментального визначення цього параметру моношаровими та суспензійною культурами в ємностях дослідної установки у специфічних умова біосинтезу ІФН з використанням гранул ІММК у якості індуктору наведені на Рис. 1. Виявилося, що для моношарових культур оптимальна початкова концентрація клітин-продуцентів знаходиться в межах 10^7 кл/мл (Рис. 1а). У випадку суспензійної культури мононуклеарних клітин крові людини оптимальною виявилася концентрація 10^6 кл/мл (Рис. 1б). Можливо, що така різниця між отриманими величинами пояснюється для моношарових культур, необхідною умовою життєдіяльності яких є

© Пенчук Ю., Карпов О., Ульберг З., Молчанець О., 2007

наявність адекватної ростової поверхні для прикріплення, подовженим у часі заповненням цієї поверхні ростучими клітинами до фізіологічно обумовлених меж. Щодо суспензійної культури мононуклеарів крові, які знаходяться в зваженому стані в об'ємі живильного середовища, то зменшення вірогідності здійснення контактів між цими клітинами та частками ІММК при підвищенні щільності завису клітин у суспензії вело далі до відповідного падіння здатності клітин до інтерфероногенезу. Загалом це явище може бути пов'язане як з високою чутливістю вказаних культур до механічних впливів і зусиль зрізу, які створюються при досягненні гомогенних умов за допомогою обертання валу установки, так і з фізіологічними особливостями досліджуваних клітинних ліній.

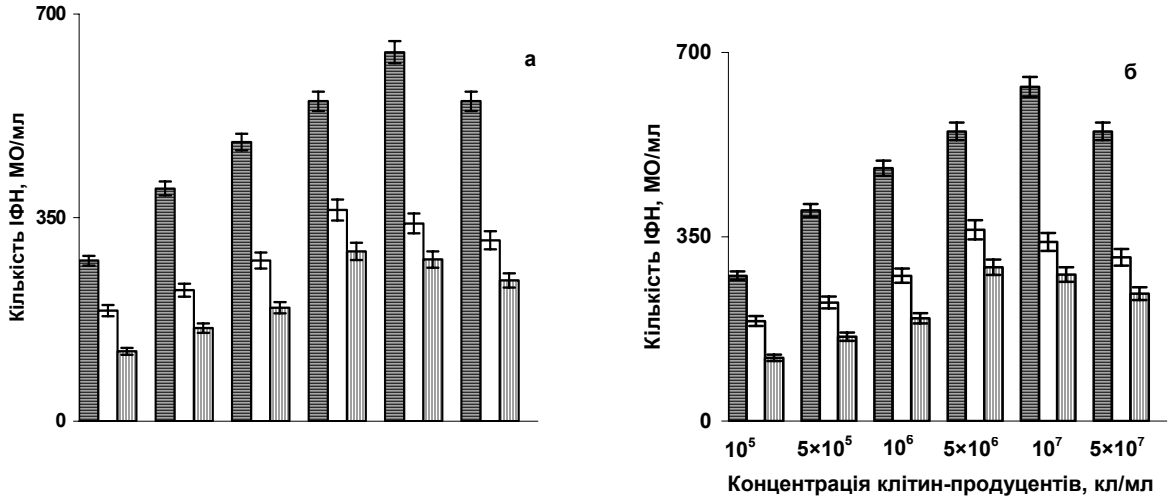

Рис. 1. Залежність рівнів інтерфероногенезу моношаровими (а) та суспензійною (мононуклеари крові) (б) культурами клітин-продуцентів від їх початкової концентрації в ємностях для культивування. Примітки: по осі абсцис – концентрація клітин-продуцентів (кл/мл); по осі ординат – активність індукованого ІФН (МО/мл); – ПТП; – L41; – L929

Одним з найбільш коштовних елементів живильного середовища для культивування еукаріотичних клітин *in vitro* є сироватка великої рогатої худоби (ВРХ), яка додається до середовища для забезпечення ефективної життєдіяльності клітин-продуцентів і, відповідно, виходу цільового продукту (у нашому випадку ІФН). До головних функцій сироватки відносяться забезпечення гормональними факторами, стимулюючими ріст клітин та їх функції; забезпечення факторами прикріплення і розпластування клітин (тобто, створення біоматриксу для моно шарових культур); забезпечення транспортними білками, які переносять гормони, мінеральні речовини, ліпіди, тощо. Найбільш важливими компонентами сироватки вважаються крупні молекули, а саме білки і зв'язані з ними продукти.

Дослідні дані щодо залежності виходу ІФН від концентрації сироватки ВРХ в живильному середовищі при культивуванні клітин обох типів культур в ємностях дослідної установки представлені на Рис. 2а, б. Встановлено, що за специфічних умов вирощування клітин моношарових культур в установці з використанням ІММК і дотримання знайдених вище величин оптимальної концентрації клітин-продуцентів, оптимальним є вміст сироватки ВХР на рівні 20% від загального об'єму живильного середовища у ємності. Подальше збільшення кількості внесеної до живильного середовища сироватки ВРХ не призводило до відповідного збільшення виходу ІФН (Рис. 2а), можливо внаслідок обмеженості її доставки до клітин при їх культивуванні у моношарі. Слід враховувати, що у випадку моношарових культур інтерфероногенез супроводжувався подальшим досить інтенсивним розмноженням клітин, які, у свою чергу, потребували додаткових поживних речовин, включаючи сироватку ВРХ. При цьому підвищення щільності середовища культивування завдяки подальшому збільшенню концентрації в ньому сироватки ВРХ утруднювало ефективну доставку найбільш фізіологічно важливих високомолекулярних компонентів до цих нових клітин. Це, на наш погляд, могло приводити до встановлення постійної величини інтерфероногенезу, що спостерігалася у дослідах.

При культивуванні за таких же умов суспензійної культури моноцитів оптимальним для інтерфероногенезу ми визначили вміст сироватки ВРХ у живильному середовищі на рівні 25% (Рис. 2б). При цьому, хоча подальше збільшення вмісту сироватки і приводило до деякого збільшення кількості синтезованого ІФН, величина 25% видалася нам найбільш оптимальною, виходячи з того, що з економічної точки зору таке збільшення є недоцільним через непропорційне підвищення собівартості кінцевого продукту – препарату ІФН.

Висновки. При циклічному способі організації культивування клітин-продуцентів ІФН, який використовувався в роботі та використанні гранул ІММК у якості індуктору, рівень біосинтезу ІФН суттєво залежав від правильного підбору початкової концентрації клітин в ємностях біореактора. Дослідно встановлені величини цієї концентрації, а також оптимального вмісту сироватки ВРХ у живильному середовищі при культивуванні клітин моношарових та суспензійної культур.

1. *Карпов 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. 30–35. 2. *Пенчук Ю.М., Карпов О.В., Поводзинський В.М., Верьовка С.В., Ульберг З.Р.* Дослідна установка для отримання інтерферонів I типу з застосуванням багаторазового комплексного індуктору. 1. Оцінка ефективності використання // Біотехнологія – 2006 – (в друці). 3. *Doyle A., Griffiths J.* Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotecnology. – John Willey & Sons, 1998. – 332 p. 4. *Ершов Ф.И., Новохатский А.С.* Интерферон и его индукторы – Москва, Медицина, 1980 – 240 с. 5. *Runstadler P.W.* The importance of cell physiology to the performance of animal cell bioreactors // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1992 – Vol. 665 – P. 380–390.

Надійшла до редакції 29.11.06

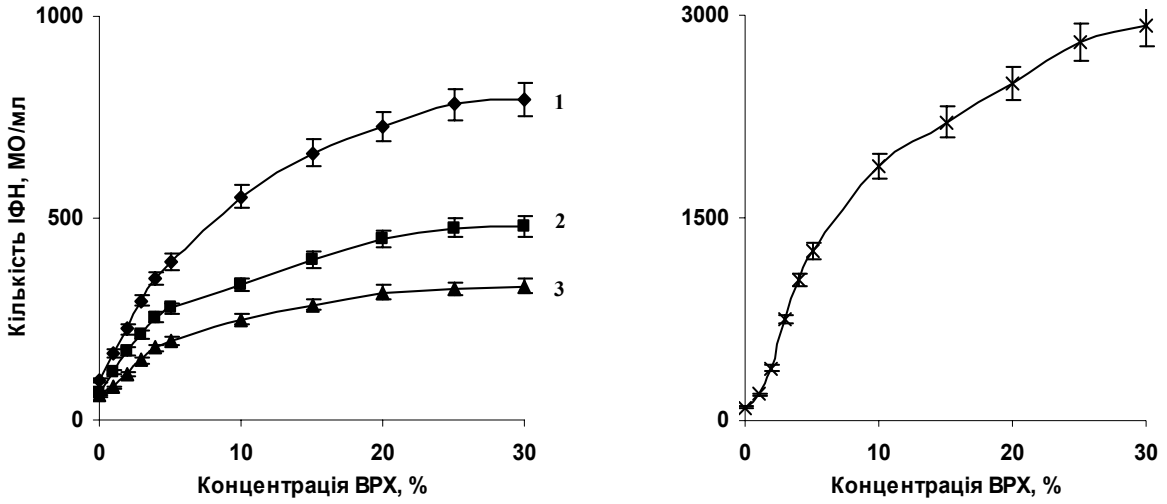

Рис. 2. Залежність рівнів інтерфероногенезу моношаровими (а) та суспензійною (б) культурами від концентрації сироватки ВРХ в живильному середовищі. Примітки: по осі абсцис – вміст ВРХ в живильному середовищі, %; по осі ординат – активність індукованого ІФН (МО/мл); 1 – ПТП; 2 – L41; 3 – L929

УДК 594.38

І. Балашов, студ., Д. Лукашов, канд. біол. наук

НАЗЕМНІ МОЛЮСКИ ПІДСТИЛКИ ШИРОКОЛИСТЯНИХ ЛІСІВ ПРАВОБЕРЕЖНОГО ЛІСОСТЕПОВОГО ПРИДНІПРОВ'Я

Досліджено щільність наземних молюсків та їх видове різноманіття у підстилці широколистяних лісів правобережного лісостепового Придніпров'я. Вивчено домінуючу групу наземних молюсків (Punctum pygmaeum, Cochlicopa lubricella, Aegopinella minor, Vitrina pellucida, Euconulus fulvus) та деякі їх екологічні особливості. Також досліджені біологічні особливості рідкісного реліктового виду Sphyradium doliolum в умовах правобережного лісостепового Придніпров'я.

Density and species diversity of terrestrial mollusks was researched in soil of the broad-leaved forests on right bank forest-steppe Dnieper drainage area. Domination group (Punctum pygmaeum, Cochlicopa lubricella, Aegopinella minor, Vitrina pellucida, Euconulus fulvus) and some ecology specific of terrestrial mollusks in soil of the broad-leaved forests has been revealed. Biologic specific of rare relict specie Sphyradium doliolum in conditions of the right bank forest-steppe Dnieper drainage area was ascertained.

Вступ. Наземні молюски займають значне місце серед деструкторів, які мешкають у лісовий підстилці. При щільності 500 екз./м^2 наземні молюски переробляють за сезон 35–43% річного опаду [6, 8]. Отже вони мають велике значення у переробці лісової підстилки та ґрунтоутворенні. Видовий склад і щільність наземних молюсків у лісовій підстилці можна використовувати для біоіндикації стану природних і урбанізованих екосистем [3, 10]. Таким чином, вивчення видового складу та щільності наземних молюсків у підстилці широколистяних лісів може представляти значний науковий та практичний інтерес.

Об'єкти та методи досліджень. Кількісні проби лісової підстилки були відібрані з площі 25Х25 см (стандартна площа проби для об'єктів таких розмірів) [3, 4]. Окремо враховували живих молюсків та порожні черепашки. Під час дослідження у червні та липні 2004-2005 рр. на території правобережного лісостепового Придніпров'я було зібрано 61 кількісну пробу лісової підстилки. Здебільшого це були проби підстилки грабового лісу на ділянках без виражених форм мезорельєфу та підстилки десяти лісових ярів в околицях Канівського природного заповідника (Черкаська область, Канівський район). Також кількісні проби збирали на ділянках широколистяних лісів в околицях міста Богуслав (Київська область, Богуславський район, 4 проби), в околицях с. Селище (Черкаська область, Корсунь-Шевченківський район, 3 проби) на Мошногірському кряжі (Черкаська область, Черкаський район, 5 проб) і у Голосіївському лісі (місто Київ, 6 проб). Досліджені лісові яри розділили на дві умовні групи – з постійним стоком води та без такого. Яри з постійним стоком води займають також і значно більшу площу порівняно з ярами без такого. Загалом було зібрано близько 2700 молюсків 26 видів. Кількісні дані у таблицях округлені до цілих частин [3, 4, 9].

Результати та їх обговорення. У кількісних пробах підстилки ділянок без виражених форм мезорельєфу загалом було виявлено 17 видів наземних молюсків. На кожній з таких ділянок було виявлено по 8–14 видів. У кількісних пробах підстилки з лісових ярів у околицях Канівського заповідника було виявлено помітно більше видів – 23.

Максимальна щільність наземних молюсків на ділянках без виражених форм мезорельєфу була зареєстрована на Мошногірському кряжі – 307±93 екз./м^2 (з урахуванням порожніх черепашок 403±112 екз./м^2), мінімальна у Голосіївському лісі – 160±48 екз./м^2 (з урахуванням порожніх черепашок 221±96 екз./м^2) (табл. 1). Помітно більша щільність була зареєстрована у лісових ярах – 883±1344 екз./м^2 (з урахуванням порожніх черепашок – 1349± 1856 екз./м^2) у ярах із постійними струмками та 310±472 екз./м^2 (546±808 екз./м^2) у ярах без постійного стоку води (див. табл. 1).

На всіх ділянках домінуючі позиції займає *Punctum pygmaeum* – від 14 до 48% загальної кількості молюсків

© Балашов І., Лукашов Д., 2007