



УКРАЇНА

(19) UA (11) 50703 (13) U
(51) МПК (2009)
G01N 33/15

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИВІРУСНОЇ АКТИВНОСТІ ПРЕПАРАТІВ ІНТЕРФЕРОНУ В ОРГАНІЗМІ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

1

2

(21) u200912107

(22) 25.11.2009

(24) 25.06.2010

(46) 25.06.2010, Бюл.№ 12, 2010 р.

(72) ЗОЦЕНКО ВОЛОДИМИР МИКОЛАЙОВИЧ,
СПІВАК МИКОЛА ЯКОВИЧ, АНТОНОВИЧ ГЕОРГІЙ
ВАЛЕРІЙОВИЧ

(73) ЗОЦЕНКО ВОЛОДИМИР МИКОЛАЙОВИЧ,
СПІВАК МИКОЛА ЯКОВИЧ, АНТОНОВИЧ ГЕОРГІЙ
ВАЛЕРІЙОВИЧ

(57) Спосіб визначення антивірусної активності

препаратів інтерферону в організмі великої рогатої худоби, який передбачає оцінку пригнічення цитотоксичної дії тест-вірусу, який **відрізняється** тим, що встановлюється здатність мононуклеарів периферійної крові протидіяти реплікації вірусів у зразках, отриманих до введення інтерферону у організм тварин і через 8 годин після, подальший контроль антивірусної дії інтерферону здійснюється у культурах мононуклеарів, вирощених поза організмом.

Галузь техніки до якої належить корисна модель: ветеринарна медицина, імунологія, вірусологія, фармакологія.

Рівень техніки: визначення ферментів у клітинах, а саме, 2,5 алігоаденілатсинтетази, вміст якої збільшується під впливом інтерферону [1]. Але цей метод досить складний у технологічному виконанні, потребує спеціального обладнання, що не дозволяє широко користуватися ним у імунологічних лабораторіях.

Прототипом технічного рішення є метод визначення активності сироваткового інтерферону [2], який базується на оцінці пригнічення цитотоксичної дії тест вірусу у культурі фібробластів L 929. Основний недолік прототипу - неможливість оцінки ефектів наведених інтерфероном (ІФН) у клітинах периферійної крові, що мають більше біологічне значення для противірусного захисту ніж його рівень у сироватці крові.

У основу корисної моделі покладено завдання розробити простий у виконанні і одночасно точний спосіб визначення антивірусної активності препаратів ІФН у організмі великої рогатої худоби, що дасть змогу досягнути повного ефекту.

Поставлена задача вирішується тим, що у якості об'єкта дослідження противірусної активності ІФН використовуються мононуклеари периферійної крові (МПК). Останні відіграють важливу

роль у забезпеченні противірусного імунітету і першими реагують на антиген. Їх противірусна активність обумовлена контактом з ІФН і мало залежить від його концентрації у сироватці крові.

Кінетика блокування реплікації вірусів у МПК після прийому ІФН у експериментах *in vivo* та *in vitro* має схожий характер. Максимальний противірусний захист МПК спостерігається через 8 годин після контакту з ІФН. МПК, що знаходились у організмі, і ті, що були отримані через 8 годин після контакту з ІФН, зберігали антивірусний стан протягом однакового годинного інтервалу. Таким чином, кінетика антивірусної активності ІФН може контролюватись в умовах *ex vivo* при використанні вирощених культур МПК. Для цього достатньо двох зразків крові, отриманих до введення ІФН і через 8 годин, тобто по досягненню максимального противірусного ефекту. Це спрощує оцінку захисної фази, викликані дією ІФН на МПК.

Технічний результат

Проведені дослідження показали, що кінетика блокування реплікації вірусу в умовах *in vivo ex vitro* (таблиця) має схожий характер. Це пояснюється тим, що МПК, які контактували з ІФН і були вирощені *ex vivo* зберігають антивірусну активність протягом такого ж часу, що і клітини, які знаходились в організмі: і в останньому відсутні механізми, які здатні продовжити антивірусний стан МПК.

(19) UA (11) 50703 (13) U

Таблиця

Тривалість антивірусного стану МПК після одноразового прийому інтерферону (титр вірусу, \log ТЦД_{50/мл})

	До введення ІФН	Після введення ІФН, годин					
		8	24	48	72	96	120
In vitro	4,2	0	0	0	1,8	2,3	3,2
Ex vivo	4,4	0	0	0	2,0	2,4	3,4
Контроль	4,4	4,2	4,8	4,5	4,8	5,0	4,8

Отримані результати показали, що МПК телят проявляли антивірусну активність протягом 48 год. У подальшому антивірусна активність клітин зменшувалась, але тенденція в умовах *in vitro* і *ex vivo* була однаковою, відмінності у показниках відсутні.

У контрольних тварин, які не отримували інтерферон, антивірусна активність МПК була низькою і не змінювався протягом досліджу.

Ознаки винаходу

Ознаками, які відрізняють спосіб визначення антивірусної активності препаратів ІФН в організмі великої рогатої худоби, є визначення антивірусного стану МПК після їх контакту з ІФН. Захисна дія ІФН на МПК має однакову протяжність, як *in vivo* та *ex vivo*. Це дозволяє тестувати антивірусний стан МПК шляхом подвійного тестування (до і через 8 годин після введення ІФН). Усі подальші дослідження проводяться в умовах *in vitro*.

За літературними даними такий підхід до визначення антивірусної активності препаратів ІФН в організмі великої рогатої худоби ще невідомий. Спосіб здійснюється наступним чином.

МПК отримують з гепаризованої крові центрифугуванням на градієнті щільності загальноприйнятими методами [3]. Ізольовані клітини ресуспензуються у середовищі RPMI - 1640 з 5% сироваткою крові телят і 50мкг/мл гентаміцину до кінцевої концентрації 4×10^6 кл/мл. Інкубування клі-

тин проводились при 37°C в атмосфері 5% CO₂.

Перед інфікуванням МПК центрифугують при 150q протягом 10хв, культуральну рідину замінюють на середовище RPMI, ресуспензують і інфікують вірусом везикулярного стоматиту (штам Індіана, інфекційна активність 10⁴ ЦПД) неадсорбовані віріони видаляються центрифугуванням при 150q протягом 10хв. МПК, що осіли ресуспензуються у середовищі RPMI - 1640 і інкубуються 18 годин. Після чого проводиться титрування вірусу мікрометодом, у культурі L929. Відсутність вірогідної різниці між показниками, що порівнюються, вказує на відсутність антивірусної активності інтерферону.

Джерела інформації

1. Baglioni C., Maroni P.A., West D.K/ 2 5 oligo (A) polymerase activity and inhibition of viral RNA synthesis sn snterferon treated Hela cells // Biochemistry. - 1979. - Vol.18. - P. 1765-1770.

2. Методические рекомендации по определению интерферонсинтезирующей способности лейкоцитов крупного рогатого скота /Симонян Г.А., Бархударян В.А., Кондрічева Н.Н. и др. - Калуга, 1983. - 15 с.

3. Новые подходы к оценке функциональной активности крови крупного рогатого скота /Полевщиков А.В., Кучевская Е.В., Зайкова Я.С. и соавт.// Ветеринария. - 1993. - №2. - С.47-49.