

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA MARUŠIČ

DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni program farmacije

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA MARUŠIČ

**PRIMERJAVA METOD TESTIRANJA »IN VITRO«
BIOLOŠKE AKTIVNOSTI PEGILIRANEGA
INTERFERONA**

**COMPARATION OF »IN VITRO« METHODS FOR
MEASUREMENT OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF
PEGYLATED INTERFERON**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008

Prvi del diplomskega dela, ki se je nanašal na metodo RGA sem opravljala v celičnem laboratoriju Kemijskega inštituta v Ljubljani, medtem ko sem metodo AVA izvajala na inštitutu NIBSC (National Institute for Biological Standards and Controls) v Angliji.

Iskreno se zahvaljujem somentorju dr. Simonu Casermanu za posredovano znanje, strokovno pomoč ter prijaznost in potrpežljivost.

Hvala tudi mentorju prof. dr. Borutu Štruklju za podporo in koristne nasvete.

Za pomoč pri izvajanju metode AVA se zahvaljujem dr. Tony-u Meager-ju.

Najlepša hvala tudi vsem, ki so mi kakorkoli pomagali pri izdelavi diplomskega dela.

Nenazadnje se zahvaljujem tudi staršem, ki sta mi omogočila študij in mi vedno stala ob strani.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Boruta Štruklja, mag. farm. in somentorstvom dr. Simona Casermana, univ. dipl. biol.

Ljubljana, maj, 2008

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Slavko Pečar

Član diplomske komisije:izr. prof. dr. Vojko Kmetec

KAZALO

1	UVOD.....	1
1.1	CITOKINI.....	1
1.1.1	<i>INTERFERON</i>	3
1.1.1.1	STRUKTURA IN KLASIFIKACIJA INTERFERONOV	3
1.1.1.2	MEHANIZEM DELOVANJA INTERFERONA.....	7
1.1.1.2.1	Protivirusno delovanje	9
1.1.1.2.2	Protiproliferativno delovanje	10
1.1.1.2.3	Imunoregulatorno delovanje	10
1.1.1.3	PRIDOBIVANJE INTERFERONOV	11
1.1.1.4	ZDRAVLJENJE Z INTERFERONI.....	12
1.1.1.5	PEGILIRANI INTERFERONI.....	15
1.1.1.5.1	Pegasys®	16
1.1.1.5.2	Pegintron®.....	18
1.1.1.6	DOLOČANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI INTERFERONA.....	20
2	NAMEN DELA	22
3	MATERIALI IN METODEDE.....	23
3.1	CELIČNE KULTURE	23
3.1.1	<i>CELIČNA LINIJA HEK ISRE SEAP</i>	24
3.1.2	<i>CELIČNA LINIJA 2D9</i>	25
3.1.3	<i>CELIČNA LINIJA A549</i>	25
3.2	DELO S CELIČNIMI KULTURAMI.....	26
3.2.1	<i>PRIPRAVA GOJIŠČ ZA CELICE</i>	26
3.2.2	<i>ODMRZOVANJE CELIC</i>	27
3.2.3	<i>PRESAJANJE CELIC</i>	29
3.3	METODA RGA	30
3.4	METODA AVA	39
4	REZULTATI.....	47
4.1	DOLOČANJE ABSORBANCE.....	47
4.1.1	<i>METODA RGA</i>	47
4.1.2	<i>METODA AVA</i>	48
4.2	IZRAČUN SPECIFIČNE AKTIVNOSTI VZORCEV	49
4.3	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	57
5	RAZPRAVA.....	59

6	SKLEP	66
7	REFERENCE	67
8	PRILOGA	71

POVZETEK

Interferoni so skupina glikoproteinov iz družine citokinov, ki se kot odgovor na prisotnost določenih virusov, bakterij, njihovih DNA, antigenov in mitogenov izločajo iz evkariontskih celic. Interferoni se vežejo na receptorje na celični površini, kar sproži kaskado signalnih reakcij v celici, ki privede do protivirusnih, protiproliferativnih in imunoregulatornih učinkov.

To daje interferonom v sodobni medicini velik pomen, saj je bila od konca 20. stoletja, ko je bil sintetiziran prvi rekombinantni interferon, odobrena njegova uporaba za zelo širok spekter indikacij, ki se nanašajo predvsem na infekcijska in proliferativna obolenja.

Še večjo terapevtsko vrednost interferonov je zaznamoval pojav druge generacije bioloških zdravilnih učinkvin rekombinantnega izvora. Konjugiranje molekule interferona z inertno molekulo polietilenglikola je izboljšalo njene farmakokinetike in farmakodinamske lastnosti, s tem pa tudi izboljšalo terapevtsko učinkovitost.

Za določanje biološke aktivnosti interferonov so bili razviti ustrezni biološki testi. V ta namen se, za določanje biološke aktivnosti »*in vitro*«, uporablja priznana farmakopejska metoda AVA (Antiviral Assay). Nedavne raziskave so pokazale, da lahko slednjo vsaj enakovredno nadomestimo z metodo RGA (Reporter Gene Assay). Zaradi vse večje uporabe pegiliranih proteinov se zastavlja vprašanje ali uveljavljene metode merjenja biološke aktivnosti ustrezajo tudi za vrednotenje aktivnosti pegiliranih proteinov. Zato smo se odločili preveriti primerljivost AVA in RGA tudi pri pegiliranih oblikah interferona.

Naša raziskava je bila zastavljena tako, da smo ugotavljali biološke aktivnosti dveh pegiliranih vzorcev (IFN- α 2a in IFN- α 2b) napram dvema nepegiliranima (IFN- α 2a in IFN- α 2b) standardoma in enemu pegiliranemu (IFN- α 2a) standardu. Poskuse smo izvajali na celičnih linijah 2D9 in A549 z metodo AVA ter na celični liniji HEK ISRE SEAP z metodo RGA.

Naši rezultati ne potrjujejo postavljene hipoteze o zamenljivosti metod AVA in RGA pri vrednotenju biološke aktivnosti pegiliranih interferonov, pri čemer pa smo potrdili prej opisano enakovrednost metod za oceno biološke aktivnosti nemodificiranih oblik. Še bolj pomembna ugotovitev je, da, poleg razlik v bioloških aktivnostih, določenih z dvema različnima metodama, opazamo razliko tudi znotraj same metode AVA v odvisnosti od izbire celične linije, na kateri merimo.

Menimo, da izmerjene razlike izpostavljajo potrebo po standardizaciji same referenčne metode za določanje biološke aktivnosti pegiliranih interferonov v smislu določitve referenčne celične linije, ki bo zadovoljivo odražala učinkovitost »*in vivo*«. Obenem naša ugotovitev predstavlja izziv za nadaljnje raziskovanje interakcij pegiliranih interferonov s celičnimi receptorji oziroma ugotavljanje razlogov različnega odziva posameznih celičnih linij na pegilirane interferone.

ABSTRACT

Interferons are the group of glycoproteins from the cytokines family which are secreted by eukaryotic cells in response to presence of certain viruses, bacteria their DNA, antigens and mytogenes. Interferons bind to cell surface receptors which induce signal transduction pathways inside the cell that result in antiviral, antiproliferative and immunomodulatory effects.

These effects make interferons to be of a great importance in the modern medicine. Since the end of 20th century, when the first recombinant interferon was synthesized, its application was approved for very wide spectrum of indications, mostly for infective and proliferative diseases.

Even greater therapeutic importance of interferons was achieved by introduction of second generation of recombinant biotherapeutics. Conjugation of interferon molecule with an inert molecule of polyethileneglycole improved its pharmacokinetic and pharmacodynamic properties and therefore it improved its therapeutics efficiency as well.

In order to measure biological activity of interferons adequate biological assays were developed. Currently the method of choice for measurement of »*in vitro*« biological activity is the pharmacopoeia method AVA (Antiviral Assay). However, recent researches indicated that it can be replaced with at least equally reliable RGA (Reporter Gene Assay) method. Because of an increasing application of pegylated proteins we questioned whether the acknowledged methods for measuring of biological activity are suitable also for evaluation of activity of pegylated proteins. That is why we decided to examine equivalence of AVA and RGA in case of pegylated interferons.

Our research was designed in a way that we measured biological activity of two pegylated samples (IFN- α 2a and IFN- α 2b) against two unpegylated (IFN- α 2a and IFN- α 2b) standards and one pegylated (IFN- α 2a) standard.

Experiments were performed on cell lines 2D9 and A549 with AVA method and on cell line HEK ISRE SEAP with RGA method.

Our results do not support the hypothesis on equivalency of AVA and RGA for measurement of biological activity of pegylated interferons but we confirmed the already mentioned equivalency of methods in case of measuring biological activity of unmodified forms. Even more important finding is that, beside the differences in measured biological activities with two different methods, we can observe also the differences within AVA method itself, in dependence of cell line on which we perform the experiment.

We can conclude that the measured differences indicate a need for standardisation of reference method itself for measurement of biological activity of pegylated interferons in a way to define a reference cell line that will reflect »*in vivo*« activity in the best way. At the same time, our finding is a challenge for further researches on interactions between pegylated interferons and cell receptors and for finding the reasons for different responses of particular cell lines to pegylated interferons.

SEZNAM OKRAJŠAV

AK - aminokislina
Arg – arginin
Asn – asparagin
AVA – Antiviral Assay
Cys - cistein
Da - dalton
DNA – deoksiribonukleinska kislina
EDTA – etilendiamintetraocetna kislina
EMCV – virus encefalomiokarditisa
FDA – Agencija za hrano in zdravila
GAS – IFN γ Activation Site
His – histidin
IFN - interferon
IL – interlevkin
ISGF 3 – Interferon Stimulated Gene Factor 3
ISRE – Interferon Sensitive Responsive Element
IU – mednarodna enota
JAK – Janusove kinaze
Lys – lizin
mRNA – informacijska ribonukleinska kislina
NK – celica ubijalka
PEG – polietilenglikol
Pfu – plack forming unit
PKR - od dvoverižne RNA odvisna proteinska kinaza
pNPP – para - nitrofenilfosfat
RGA – Reporter Gene Assay
SDS – natrijev dodecilsulfat
SEAP – sekretorna alkalna fosfataza
Ser - serin
STAT – Signal Transducers and Activators of Transcription
TNF – dejavnik tumorske nekroze
Tyr - tirozin

1 UVOD

1.1 CITOKINI

Razvoj tehnologije rekombinantne DNA je mejnik novega obdobja v zgodovini zdravljenja najrazličnejših bolezni.

V sodobni medicini in farmacevtski industriji zavzemajo terapevtski proteini že zdaj posebno mesto, vendar njihov čas šele prihaja. Glede na to, da se je njihova uporaba začela šele v novejšem času, zagotovo predstavljajo nove možnosti in upanja za prihodnost.

Ravno rekombinantni citokini, med katere sodijo tudi interferoni, so v farmacevtski biotehnologiji zabeleženi kot eni prvih rekombinantnih izdelkov, katerih uporabo v medicini so odobrili regulatorni organi. Njihova pomembnost je velika, predvsem na področju malignih in infekcijskih bolezni. (1)

Citokini so skupina manjših molekularskih proteinov z maso od 8 do 25 kDa. Med seboj so si strukturno zelo podobni ter sodijo v družino glikoproteinov imenovano hemopoetini. V telesu nastopajo kot signalne molekule, ki omogočajo komunikacijo med celicami in s tem uravnavanje večine bioloških procesov. Delujejo tudi kot modulatorji imunskega sistema.

Nekatere lastnosti citokinov so zelo podobne hormonom in ravnim faktorjem, saj vse tri skupine predstavljajo izločene molekule mediatorjev, ki po vezavi na tarčne celice, sprožajo biološke učinke. Osnovna razlika med citokini in ravnimi faktorji je v tem, da slednji nastajajo konstitucijsko, medtem ko je izločanje citokinov natančno uravnavano. Nadalje, hormone izločajo specializirane žleze, delujejo pa na oddaljene specifične celice. Nasprotno temu, citokine izločajo različni tipi celic, učinkujejo na kratke razdalje in sicer na zelo različnih celicah. (2)

Citokini sodelujejo v različnih imunskih in vnetnih dogodkih v organizmu, kakor tudi v uravnavanju hemopoeze ter celičnega razmnoževanja in diferenciacije. Delujejo z vezavo na celične receptorje, kar povzroči verigo signalnih reakcij znotraj celice. S tem vplivajo na delovanje določenih transkripcijskih dejavnikov in na od njih odvisno izražanje genov. Pomnožijo lahko število receptorjev za ostale signalne molekule, inhibirajo lastno delovanje ali pa vplivajo na sproščanje drugih citokinov. (2)

Prisotnost citokinov v krvi je eden izmed prvih znakov infekcije. Sodelujejo namreč v

skoraj vseh stopnjah gostiteljevega odgovora na virusno okužbo, kar vključuje nadzor vnetnih procesov, indukcijo antivirusnega stanja in prilagoditev organizma. Predstavljajo način komunikacije med prirojeno in pridobljeno imunostjo. Pri odgovoru na virusno okužbo delujejo tako lokalno kakor tudi sistemsko. Primer systemskega učinka je vpliv na živčni sistem, kar posledično povzroči simptome kot so somnolenca, letargija, bolečine v mišicah, zmanjšanje apetita, navzeja. Učinki citokinov se kažejo tudi s stimulacijo jeter k proizvodnji proteinov akutne faze, slednji pa sodelujejo pri popraviljanju tkivnih poškodb in pri odgovorih na infekcijo. V kostnem mozgu citokini delujejo na rast in dozorevanje limfocitov ter ostalih celic nujnih za obrambo pred okužbo. (3)

Glede na mesto delovanja poznamo avtokrine (delujejo na celice, ki jih sproščajo), parakrine (delujejo v neposredni bližini njihovega izločanja) in endokrine citokine (s krvjo se prenašajo v bolj oddaljene regije v organizmu in učinkujejo na različna tkiva). (2)

Najpomembnejša lastnost citokonov je pleiotropnost, kar pomeni, da v različnih tarčnih celicah sproščajo različne biološke učinke. Njihov učinek je včasih tudi sinergističen ali antagonističen. Zaradi tega nekateri citokini ne predstavljajo idealne tarče za razvoj zdravilne učinkovine, saj so premalo specifični, oziroma sprožajo različne molekularne odzive. (2)

Čeprav je včasih težko postaviti ostre meje med citokini in ostalimi mediatorji, v družino citokinov ponavadi uvrščamo: interlevkine, interferone, hematopoetske rastne faktorje, faktor tumorske nekroze in podobne polipeptide, različne celične rastne faktorje in kemokine. Glede na njihovo strukturo, citokine lahko razdelimo v dve osnovni skupini, tiste ki so zgrajeni pretežno iz α -vijačnic (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, interferoni, spodbujevalni dejavnik rasti kolonij, eritropoetin...) ter tiste, pri katerih prevladuje ploskev β (IL-1, rastni dejavnik za trombocite, družina TNF...). (3)

1.1.1 INTERFERON

Interferoni (IFN) so biološko aktivni proteini iz družine citokinov, ki se sintetizirajo in izločajo v somatskih celicah sesalcev. (5) Sodelujejo v obrambnem odgovoru na tumorske celice ali ob vdoru tujih dejavnikov kot so virusi, bakterije in paraziti. Njihovo delovanje je protivirusno, protibakterijsko, protitumorno in imunoregulatorno. (1) (7)

Poimenovanje izhaja iz njihovega delovanja, saj posegajo (»interferirajo«) v proces pomnoževanja virusov. To pomeni, da po virusni okužbi, nekaj časa omejujejo uspešnost okužbe z drugimi virusi. Za slednje odkritje sta zaslužna Alick Isaacs in Jean Lindenmann, ki sta leta 1957 pokazala, da lahko izpostavitve piščančjega zarodka toplotno inaktiviranemu virusu influence prepreči okužbo z živim virusom. Iz tega sta sklepala, da obstaja snov, ki se pri izpostavitvi virusom sprošča iz celic, in ovira vstop drugim virusom. (1)

1.1.1.1 STRUKTURA IN KLASIFIKACIJA INTERFERONOV

IFN je zgrajen iz beljakovinske makromolekule, na katero so vezane oligosaharidne stranske verige. Predstavlja družino proteinov, ki jih, glede na aminokislinsko zaporedje in tridimenzionalno strukturo, lahko razdelimo v različne družine. (1)

Čeprav je nomenklatura za poimenovanje različnih skupin interferonov dokaj kompleksna, se danes največ uporablja poimenovanje z grškimi črkami. (7)

IFN α predstavlja skupino dvanajstih strukturno podobnih proteinov s 165 do 166 AK, ki jih proizvajajo limfociti B, limfociti 0 in makrofagi (levkocitni ali limfoblastni IFN), pri fibroblastnem IFN β in limfocitnem IFN γ obstaja le po en predstavnik družine, medtem ko sta IFN κ in ω zelo podobna IFN α . Obstaja pa tudi IFN τ , ki je bil izoliran iz prežvekovalcev ter, poleg zaviranja razmnoževanja virusov, uravnava tudi sintezo progesterona. (1) (5) (7)

Ne glede na razlike v zaporedju AK imajo družine α , β , κ , τ in ω zelo podobno prostorsko strukturo, ki sestoji iz tesno prilegajočih se α vijačnic. Na osnovi omenjenih strukturnih ter bioloških in biofizikalnih lastnosti, se uvrščajo v skupino IFN tipa I. Za razliko od njih ima družina γ homodimerno strukturo, ki je nestabilna v kislem okolju in se veže na drugačne celične receptorje zaradi česar jo uvrščamo v skupino IFN tipa II. Značilnosti obeh skupin so zbrane v preglednici I. (5)

Obstajajo tudi številni podtipi IFN tipa I (IFN- α 2a, IFN- α 2b, IFN- α 2c, IFN- β 1a, IFN- β 1b),

ki se razlikujejo le v eni aminokislini. Poleg naravnih IFN pa se za zdravljenje uporabljajo še rekombinantni IFN- α 2a, IFN- α 2b, IFN- β 1a, IFN- β 1b in IFN γ . (7)

Preglednica I: Značilnosti interferonov glede na skupine (1)

	Tip I		Tip II
značilnosti	stabilni v kislem, ohranijo aktivnost po izpostavljanju SDS		ni stabilen v kislem, se inaktivira po izpostavljanju SDS
masa	19 – 24.000 Da		50.000 Da
glavni tip	družina α levkocitni	družina β fibroblastni	γ limfocitni
št. AK	165 (IFN- α 2) 166 (vsi ostali podtipi)	166	146
št. podtipov	vsaj 15	2	0
število genov	18 IFN- α nealelnih genov	1	1
induktoji	tuje celice, z virusi inficirane celice, tumorske celice, bakterijske celice, virusne ovojnice	virusne in druge tuje nukleinske kisline, mikrobnimi produkti	T limfocitni mitogeni, antigeni
proizvajalci	levkociti (limfociti B, 0, makrofagi)	fibroblasti, epiteljske celice, makrofagi	limfociti T, celice NK

Interferon alfa (IFN α)

IFN α je družina najmanj 12 heterogenih proteinov z molskimi masami v območju med 16 in 27 kDa, ki kažejo strukturno podobnost in podobno, toda ne povsem enako biološko aktivnost. (8) (9)

Strukturo lahko opišemo s petimi α vijačnicami, od katerih štiri tvorijo vzporedni šop. Povprečna molekulska masa IFN- α 2a je 19.237,2 Da, IFN- α 2b pa 19.265 Da. (1)

Geni za IFN α so na kromosomu 9. Nimajo intronov in kodirajo proteine, ki vsebujejo od 165 do 166 AK. Geni za njihove receptorje so na kromosomu 21. Receptorje interferonov izražajo vse zvrsti celic. (1)

Med aminokislinami so štirje cisteini, ki tvorijo disulfidne mostove in sicer na mestih 1 – 99 in 29 – 139. (6)

Strukturne razlike med podskupinami IFN- α 2 so majhne in sicer le v AK na mestih 23 in 34 (preglednica II). Tako je edina razlika med IFN- α 2a in IFN- α 2b v aminokislini Lys oziroma Arg na mestu 23, kar je posledica zamenjave gvanina z adeninom na nukleotidnem mestu 137. IFN- α 2b in IFN- α 2c pa se razlikujeta v AK na mestu 34, kjer se pri prvem nahaja His pri drugem pa Arg. (1) (7)

Preglednica II: Pregled strukturnih razlik med podskupinami IFN- α 2

	AK 23	AK 34
IFN- α 2a	Lys	His
IFN- α 2b	Arg	His
IFN- α 2c	Arg	Arg

Rekombinantni IFN- α 2 je prvi IFN, ki je bil leta 1986 s strani FDA odobren za zdravljenje malignih in virusnih obolenj.

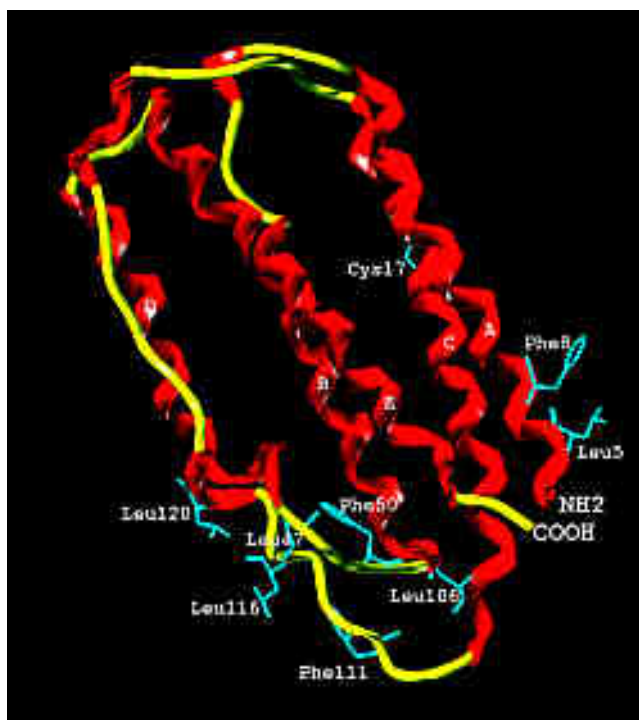
V evropski farmakopeji je predstavljen s samostojno monografijo, ki ga opisuje kot bistro brezbarvno ali rahlo rumenkasto raztopino, ki ne vsebuje manj kot 2×10^8 IU IFN- α 2a na mililiter in aktivnost katere ni manjša od $1,4 \times 10^8$ IU. na miligram proteina. (9)

Interferon beta (IFN β)

IFN β je protein iz 166 AK, ki v telesu nastaja v fibroblastih. Njegova struktura (slika 1) v približno 20 do 30 % ustreza strukturi IFN α , ima pa tudi podobne učinke in se vežeta na isti receptor. Od IFN α ga loči večja hidrofobnost in glikoziliranost.

Geni za IFN β se nahajajo na kromosomu 9, poleg genov za IFN α .

Rekombinantni IFN β so sintetizirali s pomočjo bakterije *Escherichia coli*, tako, da so Cys na 17. mestu zamenjali s Ser. Tak produkt so označili kot IFN- β 1b. (1) (5) (10)

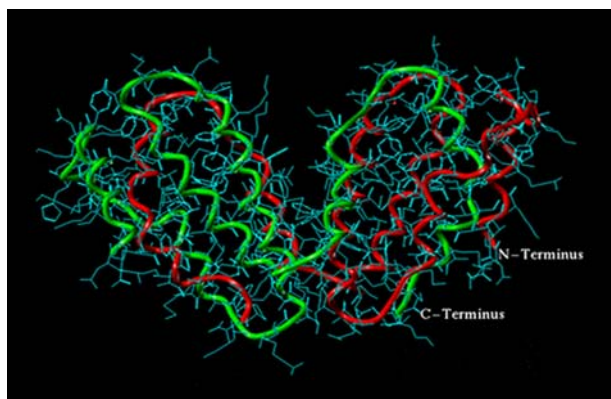


Slika 1: Struktura IFN β (11)

Interferon γ (gama)

IFN γ je levkocitni IFN s strukturo homodimernega glikoproteina. Podenoti se medsebojno povezujeta z dvema vodikovima vezema, tako da se končna amino skupina ene podenote veže s končno karboksilno skupino druge podenote in obratno. IFN γ gradi 166 AK, od katerih je 20 do 23 signalnih.

Struktura IFN γ je ponazorjena na sliki 2. Gen, ki kodira IFN γ je na kromosomu 12, gen za njegov receptor pa na kromosomu 9. Obstajata dve obliki IFN γ z molekulskima masama 20 in 25 kDa, medtem ko oblike z večjo molekularno maso tvorijo dimere in tetramere. (1) (12)



Slika 2: Struktura IFN γ (13)

Interferon delta (IFN δ)

IFN δ je monomer s 149 AK in N-glikozilacijo, najverjetneje na asparaginu 79. Fizikalno kemijske lastnosti (stabilnost v kislem, termolabilnost, občutljivost na redukcijo, sposobnost renaturacije, območje specifične aktivnosti) ga uvrščajo v skupino IFN tipa I, z

izjemo bazične izoelektrične točke, ki je lastnost bolj podobna IFN tipa II. (1)

Interferon τ (tau)

IFN τ je bil izoliran iz ovce leta 1982. Ugotovljeno je, da ima zelo podobno AK zaporedje kot IFN α . Veže se na iste receptorje in enako zavira razmnoževanje virusov. Pri govedu naj bi zagotavljal tvorbo progesterona, nujnega za ohranitev plodu, medtem ko njegova vloga pri človeku še ni popolnoma raziskana, vendar je zaradi nizke toksičnosti zelo zanimiv za terapevtsko uporabo. (1)

Interferon omega (IFN ω)

IFN ω je levkocitni interferon, sestavljen iz 172 do 174 AK. V 57 % do 63 % je enak IFN α in je bil izvorno imenovan IFN α_{II1} . (1) (5)

1.1.1.2 MEHANIZEM DELOVANJA INTERFERONA

IFN nastaja v celicah pod vplivom različnih signalov. Primer je akumulacija dvoverižne RNA, ki je produkt pomnoževanja DNA in RNA virusov. Poleg tega obstajajo še številni drugi signali, kot so strukturni proteini nekaterih virusov in celični proteini akutne faze pri stresu, ki spodbujajo sproščanje IFN tudi iz neokuženih celic (nezrele dendrične celice). Sproščanje se začne že nekaj ur po okužbi in upade po približno 10 urah. Količina in aktivnost nastalega IFN zelo nihata glede na različne induktorje. (4)

Delovanje IFN temelji na vezavi na specifične receptorje na površini tarčne celice. Temu sledi veriga reakcij za prenos signala v jedro ter spremembe izražanja več genov, kar povzroči različne učinke. IFN tipa I in II se vežeta na različne receptorje in sprožita različne signalne reakcije oziroma prepise genov, čeprav se njuni signalni poti tudi delno prekrivata. (1) (5)

Receptor za IFN I je zgrajen iz podenote IFN- α R1, ki veže le določene podtipe IFN α in podenote IFN- α R2, ki lahko veže vse podtipe IFN α in β . Po vezavi na receptor se sproži tirozin fosforilacijska veriga reakcij in sicer po aktivaciji tirozinske kinaze 2 (TYK2) in kinaz Janus (JAK). Na ta način se fosforilirajo latentni citoplazemski transkripcijski aktivatorji – proteini STAT (STAT1 α , STAT1 β in STAT2). Ti se po dimerizaciji vežejo na tretji citosolni protein p48 in tvorijo transkripcijski kompleks ISGF 3, ki se v naslednji fazi premakne v jedro in aktivira promotorske elemente v ISG (zaporedja ISRE). V 30 minutah po vezavi IFN na receptor se do 50-krat zveča prepisovanje genov, ki vsebujejo

promotorska zaporedja ISRE, in ti udejanijo učinke značilne za IFN I. (1) (5)

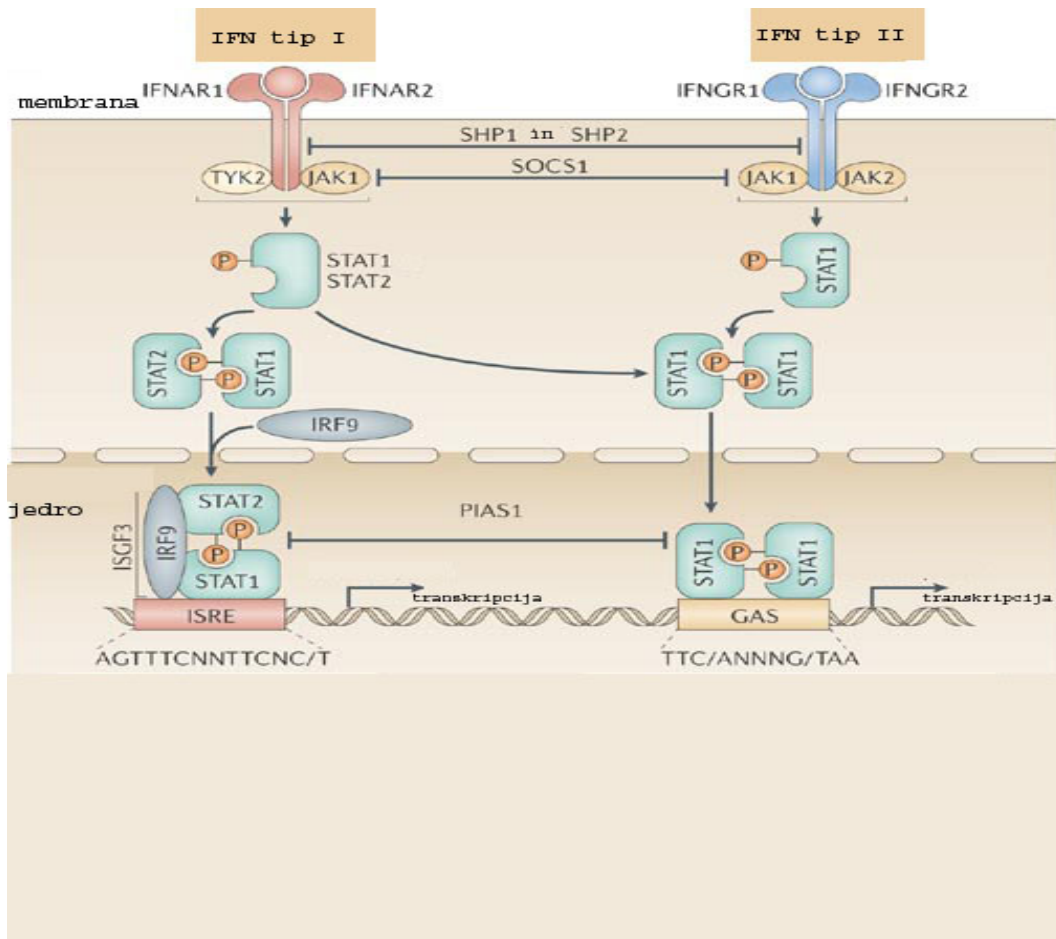
Receptor za IFN II sestavljata dve podenoti; podenota IFN γ R1, ki veže ligand IFN γ ter podenota IFN γ R2, ki je nujna za prenos signala. Po vezavi na ta receptor se aktivirata dve vrsti kinaz Janus JAK1 in JAK2, ki nato omogočita fosforilacijo proteina STAT1 α . Po nastanku njegovega homodimera se le-ta premakne v jedro in se veže na mesto GAS, kar sproži prepisovanje določenih genov.

Prav zaradi proteina STAT1 α , ki je skupen obema signalnima potema, se lahko opazi določeno prekrivanje med aktiviranimi promotorskimi zaporedji ter posledično tudi med proteini katerih prepisovanje je vzbujano po signalnih poteh IFN I in IFN II. (1) (3) (5)

Sproščanje IFN se začne že nekaj ur po virusni okužbi in skupaj z vnetjem in povišano telesno temperaturo, predstavlja nespecifični obrambni mehanizem telesa.

Po sproščanju v organizmu deluje IFN na več različnih načinov, kar vključuje vpliv na proliferacijo in diferenciacijo celic, spremembo imunskega odgovora ter inhibicijo replikacije številnih virusov. (1)

Slika 3 ponazarja verigo reakcij, ki se sprožijo po vezavi IFN I in IFN II na njuna receptorja.



Slika 3: Kaskada signalnih reakcij ob vezavi IFN na receptor; prirejeno po (14)

1.1.1.2.1 Protivirusno delovanje

Prav po protivirusnem delovanju je interferon dobil svoje ime. Sposoben je namreč posredovati oz. »interferirati« pri pomnoževanju virusov v okuženih celicah.

Takoj po infekciji se prične IFN sproščati iz okuženih celic. S krvjo kroži po celem telesu, na samem mestu okužbe pa so njegove koncentracije najvišje. (4)

IFN na viruse ne deluje neposredno temveč deluje preko receptorjev na površini celice, ter v celicah sproži tvorbo proteinov, ki so odgovorni za njegove učinke.

Na ta način vpliva na različne stopnje življenjskega ciklusa virusa. Inhibira lahko vdiranje virusov v celice in slačenje virusa ter sintezo virusne mRNA in proteinov. Od vseh delovanj je verjetno najpomembnejši učinek na prepisovanje virusnega genoma v virusne proteine. Po drugi strani pa vpliva tudi na imunsko uničenje okuženih celic, kakor tudi na spreminjanje njihove citoplazemske membrane. (1) (4)

Znano je, da IFN sprožijo sintezo več kot 300 celičnih proteinov, njihove koncentracije pa se med seboj in v odvisnosti od vrste IFN in tarčnih celic zelo razlikujejo. Njihovo

sproščanje je lahko tudi posledica vpliva drugih stimulusov kot so dvojnovijačna RNA, bakterijski lipopolisaharidi, TNF- α ali Il-2. (4)

Primer proteina, katerega delovanje uravnava IFN je od dvojnovijačne RNA odvisna 2,5A-sintetaza, ki katalizira nastanek neobičajnega oligonukleotida ppp(A2'p)nA(2,5A) nujnega za aktivacijo endonukleaze Rnaze L. Slednja povzroči razpad virusne mRNA, ki je potrebna za replikacijo nekaterih virusov. (3) (5)

IFN I inducira tudi nastanek od dvoverižne RNA odvisne proteinske kinaze PKR, ki fosforilira in deaktivira inicijacijski faktor eIF2, ki je vključen v poliribosomalno prevajanje virusne mRNA. (5)

Razen omenjenih splošnih mehanizmov, ki se aktivirajo pri najrazličnejših tipih virusov, obstajajo tudi bolj specifični proteini, ki se sintetizirajo le pri določenih virusnih okužbah. Takšen je protein Mx, ki inhibira pomnoževanje virusa influence z vplivom na prepisovanje virusne mRNA v jedru. (3)

1.1.1.2.2 Protiproliferativno delovanje

Protiproliferativni učinek je temelj protitumorskega delovanja. IFN vpliva na celični ciklus in na aktivnosti nekaterih specifičnih znotrajceličnih encimov. (3)

Dokazano je bilo, da IFN kaže močno selektiven protiproliferativen učinek na tumorske celice ter zavira razmnoževanje onkogenih virusov, poleg tega pa tudi pospešuje lizo tumorskih celic z aktivacijo gostiteljevih citotoksičnih efektorskih celic. (1)

Zgoraj omenjena sistema (2,5A-sintetaza - Rnaza L in PKR - eIF2) sodelujeta tudi pri uravnavanju celične proliferacije in apoptoze.

Podoben učinek ima tudi z IFN I posredovana inhibicija od ciklina odvisne CDK-2 kinaze, ki vpliva na fosforilacijo proliferatornih signalnih molekul v retinoblastomu, posledica česar je protiproliferativni učinek. S podobnim učinkom delujejo še številni drugi mehanizmi, kot so zvečana rigidnost celic, poraba osnovnih metabolitov in zaviranje onkogenov. (3) (5)

1.1.1.2.3 Imunoregulatorno delovanje

IFN uravnava imunski sistem na različne načine, pri čemer ima najpomembnejšo vlogo IFN γ . Oba tipa IFN (I in II) vplivata na delovanje limfocitov T in B (in s tem tudi na nastanek protiteles, na specifično citotoksičnost limfocitov T, zavračanje presadkov in

pozno preobčutljivost). Delujeta na način, ki povečuje izražanje molekul na celični površini, kot so β 2-mikroglobulin, MHC I, imunoglobulin G – Fc receptor. (1) (5)

IFN α ima številne pleiotropične učinke med katere sodijo že predhodno omenjeno zvišanje membranskih antigenov (MHC I) in adhezijskih molekul ter pospeševanje diferenciacije različnih limfoidnih celic, aktiviranje efektorskih celic (povečana aktivnost celic NK in makrofagov, tvorba limfocitov T), vpliv na citotoksičnost in nastanek citokinov ter vpliv na proliferacijo limfoidnih celic in specifični vpliv na endotelijske celice (antiangiogeneza in povečanje celičnih adhezijskih molekul). (1)

Za razliko od IFN I je IFN II sposoben vzbujanja tako sinteze MHC II kakor tudi določenih celičnih adhezijskih molekul kot so ICAM-1 in 9-27/Leu13. Sodeluje tudi pri oksidativnem stresu in sicer z vplivom na makrofage in nevtrofilce, ki proizvajajo kisikove radikale. (3) (5)

Preglednica III vsebuje pregled vseh učinkov IFN.

Preglednica III: Učinki IFN (1)

Protivirusno delovanje	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibicija prevajanja virusne RNA
Protitumorsko delovanje	<ul style="list-style-type: none"> • Neposredno zaviranje celične delitve • Neposredno ubijanje tumorskih celic z IFN γ • Zaviranje tumorogenih virusov • Aktivacija senzibiliziranih limfocitov T (celic NK, ADCC celic nič, makrofagov)
Imunoregulatorno delovanje	<ul style="list-style-type: none"> • Aktivacija makrofagov • Inhibicija celično posredovane imunosti • Delovanje na limfocite B in tvorbo protiteles • Delovanje na limfocite T – povečana reaktivnost citotoksičnih celic T • Večja aktivnost celic NK • Spremembe celičnih membran (več antigenov MHC I in MHC II) • Delovanje na interlevkine
Protibakterijsko delovanje	<ul style="list-style-type: none"> • Aktivacija makrofagov

1.1.1.3 PRIDOBIVANJE INTERFERONOV

Zaradi izredno nizkih količin in nizke čistosti je pridobivanje IFN po postopku

stimulacije človeških celic z induktorji IFN zelo težavno in neekonomično. Kljub temu so do leta 1988 iz levkocitne frakcije krvi pridobivali obogateno zmes naravnih interferonov. Glede na tip IFN, ki ga želimo pridobiti, se lahko uporabljajo različne kombinacije celic in induktorjev (preglednica IV). (1)

Preglednica IV: Vrste celic in induktorjev za pridobivanje različnih IFN

	Tip celic	Induktor
IFN α	levkociti	virus parainfluence
IFN β	fibroblasti, epitelijske celice	sintezni dvojno verižni RNA induktorji
IFN γ	limfociti T	antigeni, mitogeni

Produktivnejši in cenejši način pridobivanja je sinteza s pomočjo tehnologije rekombinantne DNA. Postopek je bil prvič izveden že leta 1980 v ZDA, pri čemer so človeško mieloblastno celično linijo KG-1 vzbujali z virusom Sendai, kar vzpodbuja nastanek mRNA. V naslednji stopnji so nastalo mRNA vbrizgali v žabje oocite in nato so tista RNA zaporedja, ki so proizvajala želeni IFN, s pomočjo reverzne transkriptaze prevedli nazaj v DNA. Z uporabo DNA polimeraze so naredili natančno kopijo (cDNA) izvirnega gena za IFN, ki so ga vključili v plazmid in nato vnesli v bakterijo *Escherichia coli*. (1)

Za industrijsko pridobivanje se bakterijske ali evkariontske celice nasadijo v fermentorje v gojišča pri določeni temperaturi, pH in sestavi hranilnih snovi. Eden od v literaturi opisanih postopkov izolacije predvideva inaktiviranje celic z žveplovo kislino in njihovo odstranitev s centrifugiranjem. (1) Biomaso pa se shrani pri -20°C . Temu sledijo postopki čiščenja IFN, ki lahko vključujejo denaturacijo proteinov, centrifugiranje preostalih celic in ultrafiltracijo. Imunoafinitetni kromatografiji sledi ločitev različnih oblik IFN na osnovi kelatov z bakrom in ionsko izmenjevalno kromatografijo ter čiščenje z gelsko filtracijo. V končni fazi se očiščeni IFN oblikuje v farmacevtsko obliko primerno za aplikacijo. (1)

1.1.1.4 ZDRAVLJENJE Z INTERFERONI

Prvi rekombinantni IFN odobren za uporabo v medicini je bil IFN- $\alpha 2$, ki ga je leta 1986 odobrila FDA za zdravljenje dlakastocelične levkemije. Leta 1991 je sledila odobritev rekombinantnega IFN γ za zdravljenje kronične granulomatoze in nato še IFN $\beta 1a$ in IFN $\beta 1b$ za terapijo multiple skleroze.

Danes se IFN uporabljajo tudi za številne druge indikacije, ki so zbrane v spodnji preglednici V. (1)

Preglednica V: Bolezni, ki se zdravijo z IFN (1)

Vrsta IFN	Indikacije	
IFN α	Limfoproliferativne in mieloproliferativne bolezni	<ul style="list-style-type: none"> • Dlakasto celična levkemija • Diseminirani plazmocitom • Kožni maligni limfom celic T • Ne-Hodgkinov limfom z nizko stopnjo malignosti • Kronična mieloična levkemija • Trombocitoza pri kronični mieloproliferativni bolezni
	Druge neoplazme	<ul style="list-style-type: none"> • Kaposijev sarkom pri AIDS-u • Karcinom ledvic • Metastatični maligni melanom
	Bolezni, ki so posledica okužbe z virusi	<ul style="list-style-type: none"> • Kronični hepatitis B in C • Koničasti kondilom
IFN β	<ul style="list-style-type: none"> • Multipla skleroza • Karcinom bazalnih celic 	
IFN γ	<ul style="list-style-type: none"> • Kronična granulomatoza • Tumor ledvic • Leišmaniaza 	

Pripravki IFN se večinoma hranijo v hladilniku pri temperaturi 2 - 8°C z izjemo IFN- α 2b, ki se 7 - 14 dni pred raztapljanjem v diluentu hrani pri temperaturi 30-35°C. Najpogostejša farmacevtska oblika IFN je liofilizirani prašek, ki se raztopi v vodi, obstaja pa tudi že pripravljena raztopina. Aplikacija je večinoma subkutana, intravenska ali intramuskularna, peroralna učinkovitost pa še ni bila potrjena.

Doziranje je zelo odvisno od vrste in stadija bolezni. Lahko je dnevno, večkrat ali enkrat tedensko s povprečnim trajanjem okoli šest mesecev. (1) (15) (16)

Primer zdravljenja hepatitisa C kaže na učinkovitostno stopnjo okoli 25 %, čeprav je v nekaterih primerih ugotovljen ponoven pojav simptomov bolezni po prenehanju zdravljenja. Zelo uspešno se uporablja tudi v kombinirani terapiji z ribavirinom, kar lahko celo podvoji uspešnost terapije. (16) (17)

Slabša stran zdravljenja z IFN je veliko število stranskih učinkov, kar vključuje simptome podobne gripi (povečana telesna temperatura, glavobol, mrzlica, potenje, utrujenost, bolečine v mišicah), ki se sčasoma zmanjšajo ali pa, po daljšem zdravljenju, povsem prenehajo. Na stranske učinke je možno vplivati tudi z uporabo analgetikov ali antihistaminikov. Poškodbe tkiva na mestu injiciranja so značilne za vse tipe IFN, čeprav se najbolj pogosto pojavljajo pri IFN- β 1b in pegiliranem IFN- α 2b. Pri nekaterih pacientih, ki so bili zdravljeni z IFN je bilo celo ugotovljeno depresivno in samomorilsko vedenje, čeprav zaenkrat še ni povsem jasno ali je vzrok v IFN ali v bolezni sami. Pri višji dozah se lahko pojavijo tudi ostali simptomi kot so diareja, navzeja, bruhanje, vrtoglavica, abdominalna bolečina, reverzibilna okvara kostnega mozga (levkopenija, trombocitopenija), nevrotoksičnost, izpadanje las, zvišan srčni utrip, težave z dihanjem, zvišane koncentracije jetrnih encimov in trigliceridov. (1) (15)

Številne študije so dokazale sinergistično delovanje kombinacij IFN α ali IFN β z IFN γ , kot tudi IFN γ s TNF- α in IFN α z IL-2. Zaradi drugačnega mehanizma delovanja, v primerjavi s klasičnimi kemoterapevtiki, obstaja možnost kombiniranega zdravljenja z učinkovinami kot so 5-fluorouracil, podofilin, zidovudin, hidroksiurea. Sinergistični učinek je opazen tudi pri terapiji s tamoksifenom ali psoralenom. IFN- α 2a, IFN- α 2b in IFN- β 1b pri sočasni terapiji z zidovudinom zvišujejo njegove plazemske koncentracije, zaradi česar je potrebno ustrezno zmanjšati doziranje. Prav tako je, zaradi podaljševanja časa eliminacije iz telesa, potrebno zmanjšati dozo pri sočasni terapiji s teofilinom. (1) (15)

Danes je na tržišču prisotnih več različnih IFN za uporabo v medicini: Roferon-A (rekombinantni IFN- α 2a), Intron-A, Viraferon, Alfatronol, Virtron (rekombinantni IFN-

α 2b), Rebetrone (rekombinantni IFN- α 2b v kombinaciji z ribavirinom), Alferon-N (rekombinantni IFN- α -n3), Avonex in Rebif (rekombinantni IFN- β 1a), Betaferon (rekombinantni-IFN β 1b), Infergen (sestavljene IFN), Actimmune (rekombinantni IFN- γ 1b) ter pegilirani IFN Pegasys (pegilirani IFN- α 2a), Peg-Intron in Viraferon PEG (pegilirani IFN- α 2b). (18)

1.1.1.5 PEGILIRANI INTERFERONI

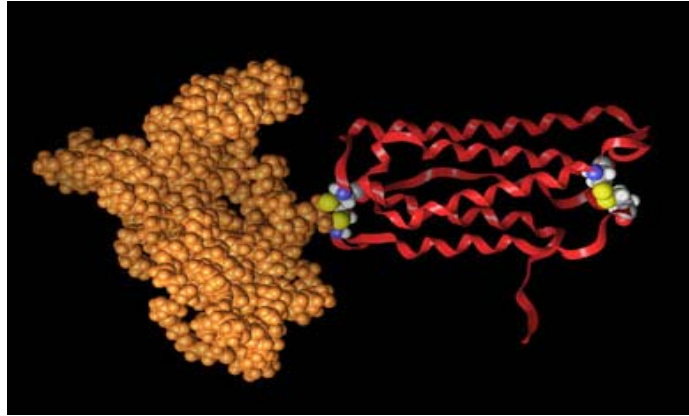
Pegilacija je postopek kovalentne vezave polietilenglikola na enega ali več lizinskih preostankov na površini proteina s ciljem optimiranja njegovih lastnosti. Značilnosti novo nastalih proteinov se razlikujejo glede na število PEG molekul, njihovo maso in strukturo. V splošnem se nanašajo na podaljšanje serumskega razpolovnega časa in posledično zmanjšanje pogostosti odmerjanja učinkovine, zmanjšanje imunogenosti in toksičnosti, izboljšanje topnosti, zadrževanje absorpcije, zmanjšanje proteolitske razgradnje, zmanjšanje renalnega očistka in optimiranje porazdelitve v telesu.

Zaradi omenjenih prednosti in s tem izboljšane terapevtske učinkovitosti se ta pristop v novejšem času uporablja tudi pri IFN. (19)

PEG je amfifilni polimer etilenglikola različnih molekulskih mas, ki lahko nastopa v obliki diola ali v obliki monometoksi polietilenglikola, pri katerem je ena terminalna hidroksilna skupina substituirana z metilno skupino. Pri kovalentni vezavi PEG na terapevski protein je oblika monometoksi polietilenglikola bolj zaželena zaradi preprečevanja medsebojnih interakcij med pegiliranimi molekulami, kar je lahko vzrok zmanjšane učinkovitosti. (19)

Pegilirani IFN- α 2b je v medicini v uporabi od leta 2001, IFN- α 2a pa od leta 2002, ko sta bila odobrena s strani FDA. Konjugata imata enako protivirusno in protiproliferativno aktivnost, saj vezana skupina PEG ne spremeni specifičnosti vezave IFN z receptorjem, vendar pa se zmanjša biološka aktivnost molekule »*in vitro*«. Po drugi strani pegilacija prinaša pomembne prednosti, kot je zmanjšana imunogenost zdravila in omogočeno doziranje zdravila le enkrat na teden. (6) (18) (19)

Slika 4 predstavlja strukturo pegiliranega IFN.



Slika 4: struktura IFN s PEG polimerom, vezanim na cisteinskih ostankih (20)

1.1.1.5.1 Pegasys®

Čeprav rekombinantni IFN- α 2a predstavlja mejnik pri zdravljenju nekaterih bolezni, še posebej hepatitisa C, so bili pacienti pri zdravljenju soočeni z določenimi težavami. Vzrok je bil zelo kratek razpolovni čas učinkovine (4 – 8 ur po intravenski ali subkutani aplikaciji), po 24 urah pa učinkovine v serumu sploh ni bilo več možno zaznati. Iz teh razlogov je bilo nujno doziranje trikrat na teden v obdobju 24 – 48 mesecev, kar je povzročalo imunogenost in različne stranske učinke. (21)

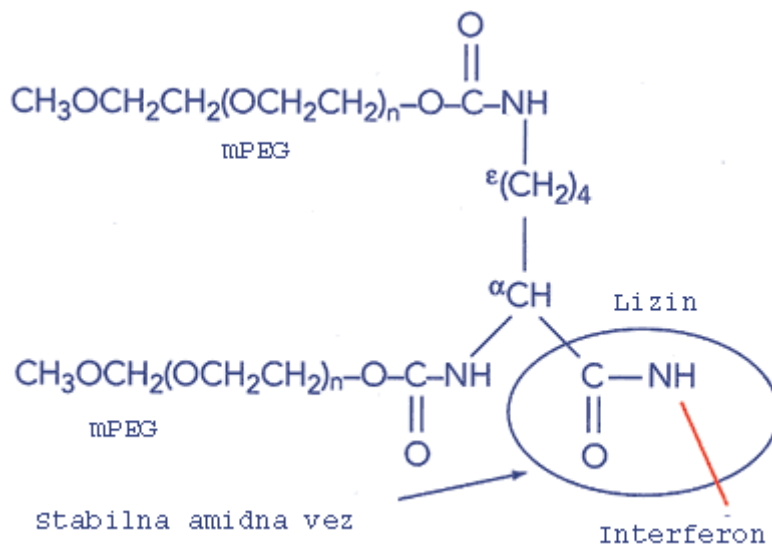
Odgovor na to je bil razvoj modificirane oblike učinkovine s kovalentno pripetim polimerom PEG, ki značilno vpliva na fizikalno-kemične in biološke lastnosti IFN.

Prvotna oblika je bila sintetizirana s pomočjo 5-kDa polimera PEG in žal ni dosegla zastavljenega cilja, ki se je nanašal na izboljšano biološko aktivnost in zmanjšanje intervala doziranja na enkrat tedensko. (21) (22)

Za razliko od tega pa 40 kDa konjugat (Pegasys®) kaže številne prednosti v primerjavi z nepegiliranim proteinom. Izboljšana je topnost in temperaturna stabilnost, zvečana je odpornost na encimsko razgradnjo in s tem podaljšan razpolovni čas v serumu, zmanjšana sta očistek skozi ledvica in imunogenost ter je posledično izboljšan biološki učinek. (21) (22)

Po Foserju je Pegasys® sintetiziran s kovalentno vezavo karbnilne skupine v mPEG reagentu na ϵ -amino skupino stranske verige lizina na IFN- α 2a, pri čemer naj bi reakcijsko zmes sestavljala IFN in 40 kDa PEG-NHS reagent v molskem razmerju 1:3 v 50 mM pufru natrijevega borata, reakcija pa poteka 2 uri pri temperaturi 4°C in pH 9.0. (21)

Kemična struktura vezave PEG reagenta na aaminsko skupino lizina je prikazana na sliki 5.



Slika 5: Kemična struktura vezave monometoksi polietilenglikolnih verig na lizinskem ostanku molekule IFN, prirejeno po (23)

Glede na to, da vsebuje molekula IFN- α 2a 11 stranskih lizinskih verig, to vključno z N koncem proteina pomeni, da obstaja 12 teoretično možnih mest za pegilacijo. Z določanjem sestave je bilo ugotovljeno, da je Pegasys® večinoma zmes šestih monopegiliranih položajnih izomer, pri katerih so verige PEG pripete na mestih K31, K134, K131, K121, K164 in K70.

Strukturi PEG-Lys (31) in PEG-Lys (134) sta pokazali večjo specifično biološko aktivnost v primerjavi s celotno zmesjo, PEG-Lys (164) približno enako, medtem ko so ostale komponente imele nižjo specifično biološko aktivnost. (21) (22)

Pegilacija IFN ne vpliva na tridimenzionalno strukturo in konformacijo proteinskega dela, spremenita pa se oblika in velikost celotne molekule. Povprečna molekulska masa PEG IFN je okoli 63 kDa, nepegiliranega IFN pa 19,2 kDa. Zaradi lastnosti molekule PEG, da nase veže 3 molekule vode se poveča hidrodinamski volumen, zato je velikost celotne molekule približno 40 krat večja. Zmanjšana je tudi nagnjenost k agregiranju molekul v raztopini.

Vezani polimer PEG sterično in termodinamsko ovira interakcije med IFN in celičnim receptorjem, kar pripomore k zmanjšani biološki aktivnosti. Le-ta je odvisna tudi od pozicijskih izomerov, oziroma od mesta vezave PEG na IFN. Tako je končni biološki odgovor rezultat kombinacije tega učinka z že zgoraj omenjenimi učinki, ki delujejo v smeri izboljšanja biološke razpoložljivosti.

Sterično oviranje pripomore tudi k zmanjšanju imunogenosti IFN, saj je onemogočena

vezava protiteles na IFN in s tem je zavrt imunski odgovor. (21) (22)

Izmerjena relativna antivirusna aktivnost *in vitro* znaša približno 7 % izvirne aktivnosti IFN- α 2a. (24)

1.1.1.5.2 Pegintron®

Tudi pri IFN- α 2b lahko zasledimo podobno evolucijo kot pri IFN- α 2a. Farmakokinetika nepegiliranega proteina je namreč zahtevala trikrat tedensko aplikacijo pri zdravljenju hepatitisa, kar je močno posegalo v kakovost pacientovega življenja. Zaradi tega se je porodila ideja o sintezi pegiliranega IFN- α 2b (Pegintron®) s ciljem podaljšanja razpolovnega časa v serumu in zmanjšanja nihanj serumskih koncentracij, zmanjšanja antigenosti, imunogenosti, toksičnosti in občutljivosti terapevtskega proteina na delovanje proteolitičnih encimov, zvečanja topnosti in temperaturne stabilnosti ter zmanjšanja ledvičnega očistka. (24) (25)

Zdravilo je pripravljeno s pripetjem linernega, hidrofilnega, nenabitega, netoksičnega, inertnega polimera PEG s povprečno molekulsko maso 12 kDa na molekulo IFN- α 2b. Reakcija se izvede s kovalentno vezavo elektrofilnega (sukcimidilkarbonatnega) derivata PEG na različne aminokisliline IFN- α 2b pri čemer nastane okoli 95 % monopegiliranega, 3 % dipegiliranega in 2 % nepegiliranega proteina. Delež različnih oblik je odvisen od pH-ja in od agregatnega stanja dodanega PEG polimera. (24) (25) (26) (27) (28)

Polimer PEG se lahko veže na različne AK in tako nastane mešanica pegiliranih IFN z različnimi relativnimi aktivnostmi glede na nepegilirani IFN (preglednica VI). Najbolj pogosto je zastopana vezava na His³⁴ (okoli 50 %), ki kaže tudi največjo aktivnost med monopegiliranimi pozicijskimi izomeri (približno 37 % IFN- α 2b). To je morda posledica depegilacije tega izomera pri vezavi na IFNAR2 ali pa na ta način pride do zmanjšane sterične oviranosti. Aktivnost celotne zmesi je okoli 28 %, kar je precej več v primerjavi s pegiliranim IFN- α 2a. Razlika je verjetno posledica manjše molekulske mase polimera PEG in posledično manjše sterične oviranosti pri interakcijah z receptorjem ter razlik v mestih vezave na IFN in razlik v osnovnem proteinu. Višja aktivnost je tudi posledica manjše stabilnosti vezi med polimerom PEG in His³⁴ na IFN, kar bi lahko povzročilo depegilacijo IFN. V tem primeru bi si opisano formulacijo lahko razlagali kot vrsto predzdravila. (24) (25) (26) (28)

Preglednica VI: Relativne aktivnosti različnih PEG izomerov glede na nepegilirani IFN- α 2b (24)

Mesto pegilacije	Relativna aktivnost
K ³¹	13 %
K ^{121/134}	25 %
K ¹³³	32 %
H ³⁴	37 %
Y ¹²⁹	23 %
K ¹³¹	15 %
K ¹⁶⁴	6 %
K ¹²¹	9 %
K ⁸³	8 %
H ⁷	22 %
K ⁴⁹	13 %
S163, K112	14 %
C ¹	11 %
nepegilirani IFN- α 2b	100 %

Preostali izomeri so pegilirani na različnih Lys, Cys, Ser, Tyr in drugih His, kar je odvisno predvsem od pH-ja reakcijskega medija. Ko le-ta narašča nad 6,5, Lys postaja dominantno reakcijsko mesto. Z njegovim znižanjem proti 4,5 pa nastajajo večje količine His⁷ pegiliranega IFN. (25) (26)

Čeprav pegilacija močno zmanjša specifično biološko aktivnost IFN, številne farmakokinetične in farmakodinamične prednosti omogočajo izboljšano bioterapevtsko učinkovitost. Uspešnost sinteze pegiliranih terapevtskih proteinov je namreč odvisna od optimiziranega ravnotežja med izboljšano farmakokinetiko in oslABLJENO aktivnostjo.

Za najbolj uspešno pa se je izkazala kombinirana terapija z ribavirinom, tako pri IFN- α 2b kot tudi pri IFN- α 2a. (24) (25) (27)

Pegilacija omogoča do deset in večkrat podaljšano zadrževanje učinkovine v serumu in sicer s povečevanjem velikosti terapevtske molekule. Tako je velikost molekule v korelaciji z razpolovnim časom v serumu kot tudi z ledvičnim očiSTKOM, kar pa ne povzroča neželjene kumulacije učinkovine v organizmu. Pegilacija med ostalim povzroča tudi zmanjšanje volumna distribucije učinkovine. (25) (26) (27)

1.1.1.6 DOLOČANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI INTERFERONA

Kot že omenjeno, interferoni po vezavi na specifične celične receptorje sprožajo biološki odgovor, ki se kaže z antivirusno, antiproliferativno, protitumorsko in imunomodulatorno aktivnostjo. Te odzive lahko izkoriščamo, za kvantitativno določanje odvisnosti biološkega odgovora od koncentracije IFN pri celičnih kulturah in s tem merimo aktivnost IFN »*in vitro*«.

Po tretiranju celičnih kultur z IFN se namreč, enako kot v živih organizmih, sproži veriga signalnih reakcij v celicah, ki se na koncu izrazi v sintezi specifičnih proteinov odgovornih za zgoraj naštete učinke. Le-ti se v bioloških testih določajo s pomočjo posrednih, merljivih parametrov, ki so v neposredni korelaciji s koncentracijo IFN. Na ta način merimo relativno biološko aktivnost vzorca IFN glede na ustrezen standard. Aktivnost vzorcev IFN se vedno določa glede na mednarodne standarde, ki so priznani v mednarodnih kolaborativnih študijah Svetovne zdravstvene organizacije ali pa z delovnimi standardi, ki so bili predhodno umerjeni glede na mednarodni standard. Aktivnost izražamo v mednarodnih enotah. Pri tem je zelo pomembno, da je mehanizem delovanja vzorca in standarda v poskusu popolnoma enak. V nasprotnem bi eksperimentalni pogoji različno vplivali na odziv celic na vzorec oziroma standard in s tem vplivali na relativno oceno biološke aktivnosti. (18) (29)

Najstarejša in najbolj uveljavljena metoda za določanje biološke aktivnosti IFN »*in vitro*« je metoda AVA, ki temelji na merjenju viabilnosti virusom izpostavljenih celic. Preživelost celic je odvisna od predhodne priprave celic z IFN. Pri najbolj pogosto uporabljeni različici AVA se celice v mikrotitrskih ploščicah tretirajo s serijskimi redčitvami IFN in se nato, za določen čas, izpostavijo virusni okužbi. Celice se potem barvajo s posebnimi barvili, katerih značilnost je, da obarvajo le preživele celice. Tako je izmerjena absorbanca barvila sorazmerna s številom živih celic in s tem tudi z biološko aktivnostjo IFN oziroma njegovo sposobnostjo zmanjšanja citopatskega učinka virusov. (18)

Z odkritjem preostalih bioloških učinkov IFN se je začel razvoj novih metod, pri katerih so biološki testi zastavljeni na podoben način kot pri metodi AVA, vendar z razliko, da temeljijo na merjenju odgovarjajočih parametrov značilnih za specifične učinke.

Tako je nastala metoda Antiproliferative Assay ter številni biološki testi, ki imajo osnovo v merjenju specifičnih proteinov, nastalih s stimulacijo z IFN.

Slednji se lahko določajo z biološko-immunološkimi testi, kjer se, po vezavi na specifična

protitelesa in sledeči konjugaciji protitelesa z encimom, dodaja substrat in nato meri nastali obarvani produkt. Nekateri z IFN inducirani proteini imajo že sami encimsko aktivnost in omogočajo neposredno merjenje (2-5A sintetaza, PKR, Rnaza L).

Z razvojem tehnologije DNA se je uveljavila tudi transfekcija celičnih linij s plazmidno DNA. Vnešeni geni so uravnavani s promotorskimi zaporedji, občutljivimi na delovanje IFN in kodirajo encime kot so alkalna fosfataza ali luciferaza. Test RGA temelji na merjenju njihove encimske aktivnosti, s čimer se posredno določa izražanje reporterskega gena, ki je sorazmerno z biološko aktivnostjo IFN, s katerim so bile celice tretirane. (18)

2 NAMEN DELA

Ideja za diplomsko nalogo je nastala kot nadaljevanje nedavno objavljenih, stabilnostnih študij mednarodnega standarda za IFN- α 2b izvedenih za WHO (Caserman in sodelavci, 2006). Merjenje biološke aktivnosti so izvedli s farmakopejsko referenčno metodo AVA, ki so jo izvajali na celični liniji 2D9. Vzporedno je bila biološka aktivnost vzorcev določena tudi z metodo RGA na celicah HEK ISRE SEAP. Celična linija HEK ISRE SEAP je transficirana z genom za sekretorno alkalno fosfatazo (SEAP) pod kontrolo promotorskega zaporedja občutljivega na IFN (ISRE). Tako se pri tretiranju teh celic z IFN aktivira gen za SEAP in sprošča alkalna fosfataza. Njeno encimsko aktivnost so izmerili spektrofotometrično po dodajanju specifičnega substrata in tvorbi obarvanega produkta. Iz absorbance obarvanega produkta so posredno sklepali na biološko aktivnost IFN standarda, s katerim so bile celice tretirane. (30)

Primerjava rezultatov pridobljenih z metodama AVA in RGA je razkrila značilno podobnost med izmerjenimi biološkimi aktivnostmi z obema metodama, pri čemer je bila pri metodi RGA variabilnost znotraj vsakega poskusa precej nižja v primerjavi s tisto pri metodi AVA. Pridobljeni rezultati torej govorijo v prid uveljavljanja metode RGA vsaj kot enakovredne, če ne še sprejemljivejše za določanje biološke aktivnosti IFN. (30)

Izhajajoč iz te ugotovitve smo želeli preveriti, ali sta metodi zamenljivi tudi za pegilirane IFN, predvsem zaradi vse bolj razširjene uporabe omenjenih oblik učinkovin. V diplomski nalogi bomo torej poskušali dokazati veljavnost hipoteze o enakovrednosti metod AVA in RGA, za določanje biološke aktivnosti pegiliranih IFN.

Raziskava bo zastavljena tako, da bomo izvajali biološke teste na dveh celičnih linijah pri metodi AVA (2D9 in A549) ter na eni celični liniji pri metodi RGA (HEK ISRE SEAP).

Aktivnosti dveh pegiliranih vzorcev IFN, ki sta trenutno v terapevtski uporabi, bomo določali napram dvema nepegiliranima in enemu pegiliranemu standardu. Ugotavljali bomo tudi

morebitne spremembe v odzivu celic na pegilirane oblike IFN.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 CELIČNE KULTURE

Celična kultura je način gojenja celic »*in vitro*« v nadzorovanih pogojih, ločeno od matičnega tkiva. Celice so lahko živalskega, rastlinskega ali človeškega izvora. Nastanejo tako, da se košček tkiva obdela mehansko ali z encimi (ponavadi raztopina tripsin-EDTA), kar omogoča porušenje medceličnih povezav. Kot začetni material se pogosto uporabljajo zarodna in tumorska tkiva, ki imajo sposobnost hitre delitve. Tako pripravljena suspenzija celic se nato doda v platenko za celične kulture, ki vsebuje hranilno gojišče.

Vsaka celična linija zahteva vzdrževanje v specifičnih pogojih, kar vključuje ustrezno temperaturo, vlažnost, atmosfero, pH, ionsko moč in gojišče.

Leta 1955 je Harry Eagle prvič opisal gojišče, ki je potrebno za rast celic. Različice tega gojišča so še vedno v uporabi, vsebovale pa naj bi različne soli, aminokisliline, glukozo in vitamine, ki jih celice ne morejo samostojno proizvesti. Ponavadi se, kot vir polipeptidnih rastnih faktorjev, dodaja tudi serum, ki stimulira delitev celic. Čeprav delo s celičnimi kulturami poteka v sterilnih pogojih, se gojiščem, za preprečevanje okužbe, pogosto dodajajo antibiotiki. (31) (32) (33)

Celične kulture pridobljene neposredno iz tkiva se imenujejo primarne celične kulture. Za njih je značilna omejena življenska doba. Rastejo namreč le dokler ne prekrijejo površine platenke in nato je potrebno presajanje. Na ta način dobimo sekundarno celično kulturo, ki ima nekoliko daljšo življensko dobo, čeprav v veliki večini primerov preživi le omejeno število pasaž. Izjema so nesmrtni celični linije, ki imajo sposobnost neskončne proliferacije in so ponavadi tumorskega izvora. (31) (33)

Nekatere celice za preživetje ne potrebujejo trdne podlage (suspenzijske kulture), večinoma pa rastejo pritrjene na podlago (adherentne kulture). Trda podlaga je običajno dno platenke za celične kulture, ki je včasih prevlečena s sestavinami zunajceličnega matriksa, ki omogočajo boljše pritrjevanje in spodbujajo rast. (33)

Celične kulture omogočajo spremljanje celične rasti in diferenciacije ter različne genetske manipulacije. S sodobno tehnologijo rekombinantne DNA se v celičnih kulturah pridobivajo različni encimi, hormoni, monoklonska protitelesa, interlevkini, protitumorne učinkovine in cepiva.

Prednost njihove uporabe je v tem, da omogočajo nadzor fizikalno-kemičnega okolja (pH, temperatura, osmolarnost, plini) kot tudi fizioloških pogojev (količina hormonov in nutrientov). Medtem ko so v organizmu prisotni skupki različnih celic, se v celičnih kulturah lahko izolirano preučujejo celice le enega tipa, vsaka celica pa se lahko klonira v kolonijo identičnih celic.

V primerjavi z raziskavami, ki se izvajajo »*in vivo*« nam »*in vitro*« pristop ponuja bolj enostavno obravnavanje biološkega materiala (vrednotenje, shranjevanje, validacija in mehanizacija določenih postopkov) ter je tudi z ekonomskega in etičnega stališča veliko bolj sprejemljiv.

Po drugi strani pa je pomankljivost vzgojenih kultur ta, da celice niso v svojem naravnem okolju in na ta način niso izpostavljene vplivu okolnih tkiv in organov, kot bi sicer bile v organizmu. Zaradi izpostavljenosti kemični in mikrobiološki kontaminaciji je rokovanje z njimi dokaj zahtevno. Slaba stran je tudi nestabilnost in pojav dediferenciacije celičnih kultur ter stroški njihovega vzdrževanja. (31) (32) (33)

3.1.1 CELIČNA LINIJA HEK ISRE SEAP

HEK so ledvične celice človeškega zarodka (Human Embryonic Kidney), ki se imenujejo tudi HEK 293 ali pa samo 293 celice. Izvorna kultura ledvičnih epiteljskih celic je bila leta 1977 transformirana z adenovirusom tipa 5 v laboratoriju Franka Grahama. (34)

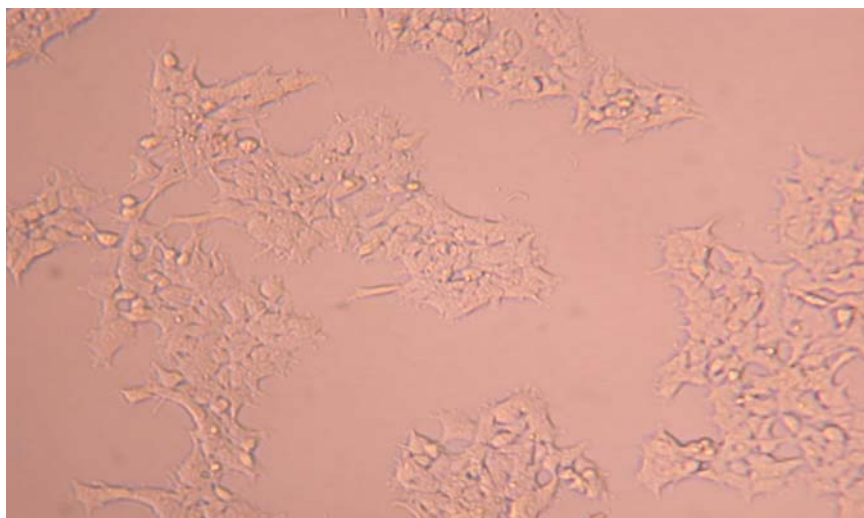
Sama celična linija ni toliko zanimiva, je pa zelo enostavna za gojenje in se zaradi tega pogosto uporablja v raziskavah in sicer za transfekcijo posameznih ali skupine genov in določanje posledično izraženih proteinov. Ugotovljena je namreč zelo visoka uspešnost transfekcije pri metodi s kalcijevim fosfatom.

Celice, ki smo jih uporabljali pri tem poskusu (HEK 293 pISRE-SEAP/neo) so bile pridobljene s transfekcijo z reporterskim plazmidom, ki vsebuje promotorska zaporedja ISRE in reporterski gen za SEAP (dr. Paul Moor, Human Genome Sciences, Rockville, Maryland 20850). S tem je v celicah omogočena tvorba encima SEAP po izpostavitvi IFN α .

Celice imajo epiteljsko morfologijo ter rastejo v enosloju, pritrjene na podlago (slika 6). (35)

Uvrščene so v skupino organizmov prvega (36), včasih pa tudi drugega (37) biološkega varnostnega razreda, kar pomeni, da predstavljajo zanemarljivo ali majhno tveganje za

človeka in okolje.



Slika 6: Celice HEK ISRE SEAP v kulturi

3.1.2 CELIČNA LINIJA 2D9

Celična linija 2D9 izvira iz humane glioblastomske linije 86HG39 (T. Bilzer, Institut für Neuropathologie, Heinrich Heine-Universität, Düsseldorf, Germany). Celice 86HG39 izražajo določene lastnosti celic T ter se na stimulacijo z IFN γ odzivajo z zaviranjem znotrajcelične rasti toksoplazem. Za zagotavljanje stabilnosti in homogenosti so bile klonirane. Eden izmed 26-ih novonastalih klonov je bila tudi celična linija 2D9 (W. Däubener, Institute for Medical Microbiology and Virology, Heinrich Heine-Universität, Düsseldorf, Germany), ki je ohranila vse značilnosti matične linije. (38)

3.1.3 CELIČNA LINIJA A549

Celična linija A549 je bila izolirana leta 1972 iz tkiva pljučnega raka pri človeku (D. J. Giard).

Raziskave M. Lieber so pokazale, da so celice A549 zmožne sinteze lecitina z visoko vsebnostjo nenasičenih maščobnih kislin in sicer z uporabo citidin difosfoholinske poti. Celice A549 včasih vsebujejo tudi inkluzijska telesa. Imajo epitelijsko morfologijo in so adherentne. Uvrščene so v prvi biološki varnostni razred. (39) (40)

3.2 DELO S CELIČNIMI KULTURAMI

3.2.1 PRIPRAVA GOJIŠČ ZA CELICE

Materiali:

Laboratorijska oprema :

- Zamrzovalnik
- Hladilnik
- Laminarij
- Vodna kopel

Pribor:

- Sterilne rokavice
- Sterilne pipete (Stripette, CORNING) - 2 ml, 10 ml, 100 ml
- Pipetnik (ACCU-JET, BRAND)
- Sterilni stekleni vsebnik - 100 ml

Kemikalije:

- Osnovno gojišče DMEM – s fenol rdečim (SIGMA, D-5671)
- Osnovno gojišče DMEM – brez fenol rdečega (SIGMA, D-5921)
- Osnovno gojišče RPMI – 1640 (SIGMA, R-0883)
- Toplotni inaktivirani goveji fetalni serum (SIGMA, F-4135)
- Toplotni inaktivirani telečji fetalni serum (INVITROGEN, 10106)
- Antibiotik / antimikotik (Gibco-BRL Life Technologies, 15240-062)
- Antibiotik – raztopina penicilina in streptomicina (SIGMA, P-0781)
- L-glutamin 200 mM (SIGMA, G-7513)
- Piruvat – raztopina natrijeve soli piruvične kisline (SIGMA, P-2256)
- Etanol (70 %)

Za vzdrževanje celične kulture in izvajanje poskusov je potrebno pripraviti ustrezno rastno in testno gojišče, ki bosta celicam zagotavljala nujna hranila za preživetje.

Najprej vzamemo sestavine iz hladilnika oz. zamrzovalnika in jih postavimo v vodno kopel na 37°C. Glede na to, da delo poteka v sterilnih pogojih, je potrebno pripraviti laminarij, sterilne pipete in pipetnik. Pri našem delu smo uporabljali nekaj različnih gojišč, ki smo jih pripravili po spodnjih recepturah.

Rastno gojišče za celice HEK ISRE SEAP:

Osnovno gojišče DMEM s fenol rdečim	500 ml
Fetalni goveji serum	50 ml
Glutamin	5 ml
Antibiotik/antimikotik (10 000 U/mL penicilina, 10 000 µg/mL streptomicina, 25 µg/mL amfotericina B)	5 ml

Testno gojišče za celice HEK ISRE SEAP:

Osnovno gojišče DMEM brez fenol rdečega	500 ml
Fetalni goveji serum	50 ml
Glutamin	5 ml

Gojišče za celice 2D9:

Osnovno gojišče RPMI-1640 s fenol rdečim	500 ml
Fetalni telečji serum	30 ml
Glutamin	5 ml
Antibiotik (10 000 U/ml penicillina, 10 mg/ml streptomicina)	2.5 ml
Piruvat	5 ml

Gojišče za celice A549:

Osnovno gojišče DMEM s fenol rdečim	500 ml
Fetalni telečji serum	50 ml
Glutamin	5 ml
Antibiotik	2.5 ml

3.2.2 ODMRZOVANJE CELIC**Materiali:***Laboratorijska oprema:*

- Vsebnik s celično banko v tekočem dušiku
- Hladilnik
- Vodna kopel

- Laminarij
- Centrifuga
- Invertni mikroskop
- Inkubator (100 % vlažnost, 5 % CO₂, 37°C)

Kemikalije:

- Etanol (70 %)
- Rastno gojišče

Pribor:

- Sterilne rokavice
- Sterilne pipete (Stripette, CORNING) – 2 ml, 5 ml, 10 ml
- Plastično stojalo
- Pipetnik (ACCU-JET, BRAND)
- Centrifugirka – 15 ml
- Plastenke za celične kulture – 25 cm², 75 cm²

Pred pričetkom dela s celičnimi kulturami je potrebno odmrzniti celice. Le-te so namreč shranjene v tekočem dušiku pri temperaturi -196°C. Najprej si pripravimo vse potrebno za nasaditev celic

Pri odvzemu vijale iz vsebnika s tekočim dušikom je potrebno uporabiti izolativne zaščitne rokavice in obrazni ščit. Med skladiščenjem je tekoči dušik v vijali lahko nadomestil zrak, ob iznosu pa se hitro upari pri čemer lahko pride do brizganja tekočega dušika ali celo eksplozije vial. Vialo s celicami zavijemo v papirno brisačo navlaženo s 70 % etanolom in počakamo da odpari morebitni tekoči dušik. Nato spodnji del vial za kratek čas potopimo v vodno kopel, da se celice čim prej do konca odtalijo in nadaljujemo z delom v laminariju. Vsebino vial (~ 1 ml) odpipetiramo v centrifugirko ter počasi dodamo približno 7 ml na 37°C segretega gojišča in previdno premešamo, saj so celice v tej fazi zelo občutljive. Vsebino centrifugiramo 2 minuti pri 1000 obratov/min, supernatant odpipetiramo in zavržemo, usedek celic pa rahlo pretresemo. Temu sledi suspendiranje celic v približno 15 ml rastnega gojišča in prenos v 75 cm² plastenko. Nasajeno celično kulturo pogledamo pod mikroskopom in shranimo v inkubatorju.

3.2.3 PRESAJANJE CELIC

Materiali:

Laboratorijska oprema:

- Hladilnik
- Vodna kopel
- Laminarij
- Centrifuga
- Inkubator (100 % vlažnost, 5 % CO₂, 37°C)
- Invertni mikroskop

Pribor:

- Sterilne rokavice
- Pipetnik (ACCU-JET, BRAND)
- Sterilne pipete (Stripette, CORNING) – 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml
- Plastično stojalo
- Centrifugirka – 15 ml
- Plastenke za celične kulture – 25 cm², 75 cm²

Kemikalije:

- Rastno gojišče
- Rastopina tripsin-EDTA (SIGMA, T-4049)
- Etanol (70 %)

Celice se presajajo v fazi, ko tvorijo enosloj na dnu plastenke in je pokritost površine med 80 % in 90 %. To lahko preverimo z mikroskopom. S tem preprečujemo neželjeno diferencijacijo in ustavljanje delitve zaradi kontaktne inhibicije, odstranjujemo mrtve celice, ki motijo rast ter dodajamo sveže hranilne snovi.

Postopek se začne s pripravo sterilnega pribora in gretjem rastnega gojišča in tripsina v vodni kopeli do 37°C. Nato odstranimo gojišče iz izhodne celične kulture in celice speremo s tripsinom. Pod mikroskopom spremljamo odlepljanje celic pod vplivom tripsina. Ko tripsin loči celice v zadostni meri, jih s trkom plastenke ob dlan odlepimo od podlage. Nato celicam dodamo nekaj mililitrov gojišča, premešamo s pipeto in prenesemo v centrifugirko. Suspenzijo centrifugiramo 2 minuti pri hitrosti 1000 obratov/min in zatem

odstranimo supernatant. Rahlo stresemo usedek celic ter jih resuspendiramo v manjši količini svežega gojišča.

Glede na to, da število celic v kulturi eksponentno narašča in se v 24 urah približno podvoji, ustrezno majhen delež suspenzije celic odpipetiramo in ga, skupaj z ustrezno količino ravnega gojišča, nasadimo v novo plastenko.

3.3 METODA RGA

Pri tej metodi smo biološko aktivnost IFN α določali s celicami HEK ISRE SEAP, ki imajo vstavljena na IFN odzivna promotorska zaporedja vezana na reporterski gen za SEAP. Test temelji na dejstvu, da se po tretiranju celic z IFN le-ta veže na celične receptorje, kar sproži verigo signalnih reakcij v citoplazmi, ki privede do prepisovanja številnih z IFN induciranih genov, med katerimi je tudi gen za SEAP.

Celicam smo na mikrotitrskih ploščicah dodali serijske redčitve enega pegiliranega in dveh nepegiliranih standardov ter dveh vzorcev pegiliranega IFN (Pegasys in Peginteron) in jih inkubirali 48 ur. Nato smo v gojišče iznad tretiranih celic, ki je vsebovalo sproščeno SEAP dodali substrat za ta encim (pNPP). Rezultat je bil nastanek rumeno obarvanega produkta, ki smo ga določali spektrofotometrično pri $\lambda = 405$ nm. Dobljene meritve smo uporabili za izračun relativne biološke aktivnosti vzorcev glede na standarde.

1. dan (presajanje celic)

Materiali:

Laboratorijska oprema:

- Centrifuga
- Inkubator (100 % vlažnost, 5 % CO₂, 37°C)
- Invertni mikroskop
- Laminarij
- Vodna kopel

Pribor:

- Sterilne rokavice

- Pipetnik (ACCU-JET, BRAND)
- Sterilne pipete (Stripette, CORNING) – 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml
- Plastenke za celične kulture – 25 cm², 75 cm²
- Plastično stojalo
- Centrifugirka – 15 ml

Kemikalije:

- Rastno gojišče za celice HEK ISRE SEAP (glej točko 3.2.1)
- Raztopina tripsin-EDTA (SIGMA, T-4049)
- Etanol (70 %)

Postopek se začne z izdelavo pasaže celične kulture HEK ISRE SEAP po protokolu, ki je opisan v poglavju 3.2.3. Celice razredčimo v razmerju 1:2, in jih shranimo v inkubatorju. Tako dobimo naslednji dan enako število visoko viabilnih celic.

2. dan (nasaditev kulture na mikrotitrne ploščice)

Materiali:

Laboratorijska oprema:

- Hladilnik
- Vodna kopel
- Laminarij
- Centrifuga
- Inkubator (100 % vlažnost, 5 % CO₂, 37°C)
- Invertni mikroskop

Pribor:

- Sterilne rokavice
- Pipetnik (ACCU-JET, BRAND)
- Sterilne pipete (Stripette, CORNING) – 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml
- Plastično stojalo
- Centrifugirka – 15 ml, 50 ml
- Plastenke za celične kulture – 25 cm², 75 cm²
- Mehanska pipeta, CORNING, 2-20 µl

- Mehanska pipeta, CORNING, 10-100 μ l
- Epice –1,5 ml
- Pinceta
- Hemocitometer
- Plastična kadička
- 12 kanalna elektronska pipeta, EPPENDORF, 20-300 μ l
- Stojalo / polnilec za elektronske pipete, EPPENDORF
- Škatle za nastavke za pipete, EPPENDORF, 20-300 μ l
- Nastavki za pipete, EPPENDORF, 20-300 μ l
- Nastavki za pipete, EPPENDORF, 200 μ l
- Sterilne mikrotitrne ploščice za celične kulture, COSTAR, 96 jamic

Kemikalije:

- Rastno gojišče za celice HEK ISRE SEAP (glej točko 3.2.1)
- Testno gojišče za celice HEK ISRE SEAP (glej točko 3.2.1)
- Raztopina tripsin-EDTA (SIGMA, T-4049)
- Raztopina tripanskega modrila (0,4 %), SIGMA
- Etanol (70 %)

Ponovimo postopek presajevanja celične kulture (poglavje 3.2.3.), vendar to pot namesto ravnega gojišča uporabimo testno.

Potem, ko smo po centrifugiranju nastali sediment celic resuspendirali v 5 ml testnega gojišča, delež suspenzije odpipetiramo v 1,5 ml epico in ga uporabimo za določanje števila celic. Celično suspenzijo najprej redčimo z raztopino tripanskega modrila in nato prenesemo na hemocitometrično ploščico. Ploščico pogledamo pod mikroskopom ter določimo število in živost celic. Tripansko modrilo namreč difundira le v mrtve celice in tako lahko iz obarvanosti celic sklepamo na njihovo živost.

Temu sledi štetje celic v štirih poljih in določanje povprečnega števila živih celic v enem polju prostornine 0,1 μ l³. Iz dobljenega rezultata, z upoštevanjem faktorja redčenja, preračunamo v število celic v enem mililitru suspenzije.

Iz tega smo izračunali volumen suspenzije celic, ki je potreben za izdelavo celične subkulture z gostoto 150 000 celic/ml.

Del celic uporabimo za nadaljevanje kulture ter ga, skupaj s 15 ml ravnega gojišča,

odpipetiramo v novo 75 cm² platenko in shranimo v inkubatorju.

Del celic in testno gojišče pa uporabimo za pripravo 55 ml celične suspenzije z gostoto 150 000 celic/ml. Suspenzijo celic prenesemo v sterilno, plastično kadičko od koder jo z 12 kanalno elektronsko pipeto nasadimo na pet mikrotitrskih ploščic, tako da je v vsaki od 96 jamic po 100 µl celične suspenzije, ki vsebuje 15 000 celic.

Ploščice hranimo v inkubatorju približno 24 ur.

3. dan (tretiranje celic z IFN)

Materiali:

Laboratorijska oprema:

- Hladilnik
- Zamrzovalnik
- Vodna kopel
- Laminarij
- Inkubator (100 % vlažnost, 5 % CO₂, 37°C)

Pribor:

- Sterilne rokavice
- Plastično stojalo
- Mehanska pipeta, CORNING, 2.0-20 µl
- Mehanska pipeta, CORNING, 10-100 µl
- Mehanska pipeta, CORNING, 20-200 µl
- Mehanska pipeta, CORNING, 100-1000 µl
- Epice – 2 ml
- Pinceta
- Plastična kadička
- 12 kanalna elektronska pipeta, EPPENDORF, 20-300 µl
- 12 kanalna mehanska pipeta, CORNING, 20-200 µl
- Stojalo / polnilec za elektronske pipete, EPPENDORF
- Škatle za nastvke za pipete, EPPENDORF, 20-300 µl
- Nastavki za pipete, EPPENDORF, 20-300 µl
- Nastavki za pipete, EPPENDORF, 200 µl

- Sterilne mikrotitrne ploščice za celične kulture, COSTAR, 96 jamic

Kemikalije:

- Testno gojišče za celice HEK ISRE SEAP (glej točko 1.4.1)
- Standard S1: IFN- α 2b, 2. mednarodni standard 1999, NIBSC, koda: 95/566 (c = 0,5 μ g/ml; biološka aktivnost = 70 000 IU/ml)
- Standard S2: IFN- α 2a, 2. mednarodni standard 1999, NIBSC, koda: 95/650 (c = 0,25 μ g/ml; biološka aktivnost = 63 000 IU/ml)
- Standard R: PEG-IFN- α 2a, NIBSC, koda: 01/594 (c = 1 μ g/ml; biološka aktivnost = 1 000 IU/ml)
- Vzorec P1: Pegintron, Schering-Plough Ltd (100 μ g/ml)
- Vzorec P2: Pegasys, Hoffmann-La Roche AG (360 μ g/ml)
- Etanol (70 %)

V prvi stopnji poskusa je potrebno pripraviti redčitve osnovnih raztopin standardov in vzorcev IFN do koncentracij kjer pride do najvišjega možnega odziva celic. To naredimo s stopenjskim redčenjem s pomočjo testnega gojišča v epicah prostornine 2 ml.

Shema redčenja je prikazana v preglednicah VII - XI.

Preglednica VII: Shema redčenja standarda S

Stopnja redčenja	1	Končna koncentracija [μ g/ml]
Začetna koncentracija [μ g/ml]	0,5	8,3 x 10⁻³
Volumen standarda [μ l]	25	Skupni faktor redčenja
Volumen gojišča [μ l]	1475	
Skupni volumen [μ l]	1500	
Faktor redčenja	60	60

Preglednica VIII: Shema redčenja standarda S2

Stopnja redčenja	1	Končna koncentracija [µg/ml]
Začetna koncentracija [µg/ml]	0,25	8,3 x 10⁻³
Volumen standarda [µl]	50	Skupni faktor redčenja
Volumen gojišča [µl]	1450	
Skupni volumen [µl]	1500	
Faktor redčenja	30	30

Preglednica IX: Shema redčenja standarda R

Stopnja redčenja	1	Končna koncentracija [µg/ml]
Začetna koncentracija [µg/ml]	1	0,33
Volumen standarda [µl]	500	Skupni faktor redčenja
Volumen gojišča [µl]	1000	
Skupni volumen [µl]	1500	
Faktor redčenja	3	3

Preglednica X: Shema redčenja vzorca P1

Stopnja redčenja	1	2	3	Končna koncentracija [µg/ml]
Začetna koncentracija [µg/ml]	100	1	0,1	1 x 10⁻²
Volumen vzorca [µl]	10	100	150	Skupni faktor redčenja
Volumen gojišča [µl]	990	900	1350	
Skupni volumen [µl]	1000	1000	1500	
Faktor redčenja	100	10	10	10000

Preglednica XI: Shema redčenja vzorca P2

Stopnja redčenja	1	2	Končna koncentracija [µg/ml]
Začetna koncentracija [µg/ml]	360	3,6	0,34
Volumen vzorca [µl]	10	143	Skupni faktor redčenja
Volumen gojišča [µl]	990	1357	
Skupni volumen [µl]	1000	1500	
Faktor redčenja	100	10,5	1050

Naslednji korak je priprava serijskih redčitev standardov in vzorcev na petih mikrotitrskih ploščicah. S tem izmerimo odziv celic preko celotnega koncentracijskega območja odziva. Najprej z 12 kanalno elektronsko pipeto odpipetiramo po 120 µl testnega gojišča v vsako jamico redčitvene plošče in nato v prvo vrstico dodamo po 120 µl vsakega predhodno razredčenega vzorca IFN v dveh paralelkah. Temu sledi mešanje vsebine v prvi vrstici z multikanalno mehansko pipeto in potem prenos po 120 µl vsake od raztopin v naslednjo vrstico ter ponovno mešanje. Postopek ponavljamo v vseh osmih vrsticah in na ta način dobimo serijsko redčenje vzorcev za faktor 2 v vsaki stopnji.

Da bi zmanjšali napake, ki so posledica izhlapevanja vzorca v robnih jamicah in vpliva položaja posameznega vzorca na ploščici, kot tudi napake pri pipetiranju z multikanalno pipeto, pri vsaki ploščici zamenjamo vrstni red vzorcev. Razporeditev vzorcev po stolpcih med ploščicami prikazuje tabela XII:

Preglednica XII: položaji vzorcev IFN na treh mikrotitrskih ploščicah

Oznake stolpcev	Ploščica 1	Ploščica 2	Ploščica 3	Ploščica 4	Ploščica 5
2, 3	S1	S2	P1	P2	R
4, 5	P1	S1	P2	R	S2
6, 7	S2	R	S1	P1	P2
8, 9	R	P2	S2	S1	P1
10, 11	P2	P1	R	S2	S1

Na mikrotitrške ploščice z nasajeno celično kulturo, ki so bile pripravljene prejšnji dan,

z mehansko multikanalno pipeto prenašamo po 100 µl raztopine IFN v vsako jamico. Prenos poteka od najnižje koncentracije IFN proti najvišji, tako da so posamezne redčitve IFN na enakih položajih kot so bile na redčitvenih ploščicah.

Ploščice s celicami, obdelanimi z dodanim IFN, postavimo v inkubator ter inkubiramo 40 do 48 ur.

4. dan (inkubiranje)

Inkubacija ploščic v celičnem inkubatorju (100 % vlažnost, 5 % CO₂, 37°C)

5. dan (določanje koncentracije nastale SEAP)

Materiali:

Laboratorijska oprema:

- Hladilnik
- Vodna kopel
- Invertni mikroskop
- Sistem za pridobivanje MiliQ vode
- Tehnica (EXACTA)
- Laminarij
- Inkubator (100 % vlažnost, 5 % CO₂, 37°C)
- Čitalec mikrotitrskih ploščic, Fluostar Galaxy BMG Labtechnologies GmbH
- Računalnik

Pribor:

- Sterilne rokavice
- Merilni valj (1000 ml)
- Stekleni vsebnik (1000 ml)
- Pipetnik (ACCU-JET, BRAND)
- Sterilna pipeta (Stripette, CORNING) – 25 ml, 100 ml
- Plastično stojalo
- Centrifugirka – 50 ml
- Plastična kadička
- 12 kanalna mehanska pipeta, CORNING, 20-200 µl
- 12 kanalna elektronska pipeta, EPPENDORF, 20-300 µl

- Stojalo / polnilec za elektronske pipete, EPPENDORF
- Škatle za nastavke za pipete, EPPENDORF, 20-300 μ l
- Nastavki za pipete EPPENDORF, 20-300 μ l
- Nastavki za pipete, EPPENDORF, 200 μ l
- Sterilne mikrotitrne ploščice za celične kulture, TPP, 96 jamic
- Aluminijasta folija

Kemikalije:

- Dietanolamin (SIGMA, D-8885)
- Magnezijev klorid ($MgCl_2$) (SIGMA, M-8266)
- Voda MiliQ
- 4 – nitrofenilfosfat dinatrijeva sol heksahidrat (pNPP) – SIGMA, N-2765
- Etanol (70 %)

Pred pričetkom dela je potrebno pripraviti pufer v katerem bomo raztopili substrat za alkalno fosfatazo. To naredimo tako, da zmešamo 900 ml MiliQ vode, 100 ml dietanolamina in 47.6 mg magnezijevega klorida (za 1000 ml pufra) ter s klorovodikovo kislino uravnamo pH na 9.8. Nato v 50 ml centrifugirki raztopimo eno tabletko (20 mg) pNPP v 20 ml prej pripravljenega pufra, da dobimo raztopino substrata s koncentracijo 1 mg/ml. Raztopino, zaradi občutljivosti substrata na svetlobo, inkubiramo v temi pri 37°C. V tem času vzamemo mikrotitrne ploščice s celicami v gojišču z IFN in z mehansko multikanalno pipeto prenesemo po 50 μ l gojišča iz vsake jamice na enake položaje na petih novih ploščicah. Prenos se vedno začne od nižjih koncentracij IFN proti višjim. Pričakujemo, da gojišče vsebuje SEAP, ki so ga sprostile celice po vezavi IFN na njihove receptorje. To dokažemo z dodajanjem substrata za ta encim in spektrofotometričnim določanjem nastalega produkta.

Ploščice s prenesenim gojiščem, kakor tudi raztopino substrata inkubiramo približno 30 minut na sobni temperaturi, da se izravna temperatura. Nato substrat prelijemo v plastično kadičko ter z elektronsko pipeto prenesemo po 50 μ l substrata v vsako jamico k gojišču. Ploščice prekrijemo z aluminijasto folijo in jih pri sobni temperaturi, s hkratnim spremljanjem razvoja rumene barve, inkubiramo 30 – 45 minut.

Zadnja faza poskusa vključuje merjenje absorbance pri $\lambda = 405$ nm s pomočjo čitalca ploščic. Iz pridobljenih vrednosti absorbance lahko sklepamo na količino nastale SEAP, ki

je proporcionalna izmerjeni absorbanci in tako ponazarja specifično aktivnost IFN.

Izračun aktivnosti vzorcev IFN

Izmerjene vrednosti absorbance vzorcev smo analizirali z računalniškim programom PLA 1,2 (Paralel Line Assay). Program poišče linerani del krivulje odvisnosti absorbance od logaritma koncentracije IFN, za vsak posamezen vzorec. S testom vzporednosti preveri ali gre za primerljive odzive celic ter iz vzporednih premikov med premicami vzorcev in standardov izračuna razlike v biološki aktivnosti. Te vrednosti smo skupaj s podatki o redčenjih vzorcev in standardov ter definiranih aktivnosti standardov, uporabili za izračun specifičnih aktivnosti vzorcev, ki se nanaša na aktivnost enega miligrama proteina.

3.4 METODA AVA

Kot pove že ime samo, ta metoda temelji na protivirusni lastnosti IFN oziroma gre za določanje zmožnosti IFN, da zaščiti celice pred citopatskim učinkom po okužbi z virusom. Metodo smo izvajali na celicah 2D9 in A549. Celice smo najprej nasadili na mikrotitrsko ploščico tako, da so tvorile sklenjen enosloj. Celicam smo nato dodali interferonski standard in vzorca IFN, za vzbujanje protivirusne odpornost. Koncentracija standarda na ploščici se je postopno spreminjala od jamice do jamice in sicer od koncentracije, ki celice skoraj povsem zaščiti pred virusi, do tiste, ki nima več zaščitnega učinka. Koncentracije vzorcev smo nanесли enako padajoče, le da so bile sorazmerno povišane glede na pričkovano nižjo zaščitno učinkovitost. Temu je po inkubaciji sledilo dodajanje primerne koncentracije virusa EMCV. Po doseženem največjem citopatskem učinku pri nezaščitenih celicah smo preživele celice pobarvali ter iz absorbance barvila sklepali na viabilnost celic. Potrebna koncentracija vzorca in standarda, ki je ohranila enako viabilnosti celic je bila osnova za izračun relativne biološke aktivnosti vzorcev IFN glede na standard. Izvedba poskusa je večinoma enaka pri obeh celičnih linijah. Manjše razlike v postopkih so v nadaljevanju posebej omenjene.

1. dan (nasaditev kulture na mikrotitrsko ploščico)

Materiali:

Laboratorijska oprema:

- Hladilnik
- Vodna kopel
- Laminarij
- Inkubator (100 % vlažnost, 5 % CO₂, 37°C)
- Invertni mikroskop

Pribor:

- Sterilne rokavice
- Pipetnik (MATRIX)
- Sterilne pipete (FALCON) – 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml
- Plastično stojalo
- Plastenke za celične kulture – 75 cm² (FALCON)
- Mehanska pipeta, GILMAN, 2.0-20 µl
- Epice –1.5 ml
- Hemocitometer
- Petrijevka
- 8 kanalna mehanska pipeta, FINNPIPETTE, 20-300 µl
- Nastavki za pipete, STARLAB GMBH, 200 µl
- Sterilne mikrotitrne ploščice za celične kulture, 96 jamic (FALCON)

Kemikalije:

- Gojišče za celice 2D9/A549 (glej točko 1.4.1)
- Raztopina tripsin-EDTA (SIGMA, T-4049)

Plastenko s celično kulturo vzamemo iz inkubatorja ter odpipetiramo gojišče. Celice speremo s po 5 ml trpsina ali fosfatnega pufra in jih nato za nekaj minut postavimo prekrite s tripsinom v inkubator. Ko se celice odlepijo s podlage jih resuspendiramo v 5 ml gojišča. Podobno kot je opisano pod točko 3.3 (2. dan), del celic uporabimo za nadaljevanje kulture. S pomočjo hemocitometra določimo število celic v enem ml in nato pripravimo 55 ml celične suspenzije z gostoto okoli 500.000 celic na ml.

Nato označimo mikrotitrne ploščice in na njih z multikanalno pipeto nasadimo po 100 µl suspenzije v vsako jamico.

Mikrotitrne ploščice postavimo v inkubator preko noči, da se celice pritrdijo na površino.

2. dan (tretiranje celic z IFN)

Materiali:

Laboratorijska oprema:

- Hladilnik
- Zamrzovalnik
- Vodna kopel
- Laminarij
- Inkubator (100 % vlažnost, 5 % CO₂, 37°C)

Pribor:

- Sterilne rokavice
- Plastično stojalo
- Mehanska pipeta, GILMAN, 2-20 µl
- Mehanska pipeta, EPPENDORF, 10-100 µl
- Mehanska pipeta, GILMAN, 20-200 µl
- Mehanska pipeta, GILMAN, 100-1000 µl
- Epice –1,5 ml
- Centrifugirka 50 ml
- 12 kanalna mehanska pipeta, FINNPIPETTE, 30-300 µl
- Nastavki za pipete, STARLAB GMBH, 200 µl

Kemikalije:

- Gojišče za celice 2D9/A549 (glej točko 3.2.1)
- Standard S1: IFN- α 2b, 2. mednarodni standard 1999, NIBSC, koda: 95/566 (c = 0,5 µg/ml; biološka aktivnost = 70 000 IU/ml)
- Standard S2: IFN- α 2a, 2. mednarodni standard 1999, NIBSC, koda: 95/650 (c = 0,25 µg/ml; biološka aktivnost = 63 000 IU/ml)
- Standard R: PEG-IFN- α 2a, NIBSC, koda: 01/594 (c = 1 µg/ml; biološka aktivnost = 1 000 IU/ml)
- Vzorec P1: Pegintron, Schering-Plough Ltd (100 µg/ml)
- Vzorec P2: Pegasys, Hoffmann-La Roche AG (360 µg/ml)

Enako kot pri metodi RGA, je najprej potrebno pripraviti predhodne redčitve standardov

in vzorcev IFN, kar naredimo s serijskim redčenjem osnovnih raztopin z gojiščem. Tako dobimo koncentracije IFN pri katerih celice dosežejo zgornji rob merjenega fiziološkega odziva.

Shema predhodnega redčenja je prikazana v preglednicah XIII - XVIII.

Preglednica XIII: Shema redčenja standarda S1:

Stopnja redčenja	1	2	3	4	Končna koncentracija [µg/ml]
Začetna koncentracija [µg/ml]	0,5	0,05	0,005	0,0005	$3,12 \times 10^{-5}$
Volumen standarda [µl]	100	100	100	100	Skupni faktor redčenja
Volumen gojišča [µl]	900	900	900	1500	
Skupni volumen [µl]	1000	1000	1000	1600	
Faktor redčenja	10	10	10	16	16000

Preglednica XIV: Shema redčenja standarda S2:

Stopnja redčenja	1	2	3	4	Končna koncentracija [µg/ml]
Začetna koncentracija [µg/ml]	0,25	0,025	0,0025	0,00025	$3,12 \times 10^{-5}$
Volumen standarda [µl]	100	100	100	200	Skupni faktor redčenja
Volumen gojišča [µl]	900	900	900	1400	
Skupni volumen [µl]	1000	1000	1000	1600	
Faktor redčenja	10	10	10	8	8000

Preglednica XV: Shema redčenja standarda R:

Stopnja redčenja	1	2	Končna koncentracija [mg/ml]
Začetna koncentracija [mg/ml]	1	0,1	5×10^{-3}

Volumen standarda [μl]	100	80	Skupni faktor redčenja
Volumen gojišča [μl]	900	1520	
Skupni volumen [μl]	1000	1600	
Faktor redčenja	10	20	200

Preglednica XVI: Shema redčenja vzorca P1

Stopnja redčenja	1	2	3	4	5	Končna koncentracija [mg/ml]
Začetna koncentracija [mg/ml]	100	1	0,1	0,01	0,001	5×10^{-5}
Volumen vzorca [μl]	10	100	100	100	80	Skupni faktor redčenja
Volumen gojišča [μl]	990	900	900	900	1520	
Skupni volumen [μl]	1000	1000	1000	1000	1600	
Faktor redčenja	100	10	10	10	20	2000000

Preglednica XVII: Shema redčenja vzorca P2

Stopnja redčenja	1	2	3	Končna koncentracija [mg/ml]
Začetna koncentracija [mg/ml]	360	3,6	0,36	$5,14 \times 10^{-3}$
Volumen vzorca [μl]	10	100	20	Skupni faktor redčenja
Volumen gojišča [μl]	990	900	1380	
Skupni volumen [μl]	1000	1000	1400	
Faktor redčenja	100	10	70	70000

V nadaljevanju poskusa smo končne redčitve vsakega vzorca IFN uporabili za nanos na ploščice s celicami. Po 100 μl vsakega vzorca smo dodali v dve jamici prve vrstice, Predhodnjem redčenju vzorcev sledi redčenje na ploščicah. Izvajamo ga tako, da z multikanalno mehansko pipeto premešamo vsebine jamic v prvi vrstici in nato prenašamo po 100 μl vsake od raztopin v drugo vrstico ter jih ponovno premešamo. Postopek

ponavljamo vse do zadnje vrstice. Na koncu zavržemo po 100 µl iz jamic v zadnji vrstici, da je v njih enak volumen gojišča kot v predhodnjih. S tem smo dobili stopenjsko redčenje vzorcev za faktor 2 v vsaki stopnji, kar je podobno kot pri prvi metodi. Na merilni ploščici tako tretiramo celice s koncentracijami IFN, ki pokrivajo celoten razpon fiziološkega odziva. Celicam v stolpcih 1 in 12 ne dodajamo stopenjsko redčenega IFN, ker jih uporabimo kot pozitivne oziroma negativne kontrole.

Shema razporeditve vzorcev po ploščicah je enaka kot pri prvi metodi (preglednica XII).

Ploščice postavimo v inkubator za približno 24 ur.

3. dan (tretiranje celic z virusom)

Materiali:

Laboratorijska oprema:

- Hladilnik
- Zamrzovalnik
- Vodna kopel
- Laminarij
- Inkubator (100 % vlažnost, 5 % CO₂, 37°C)

Pribor:

- Sterilne rokavice
- Plastično stojalo
- Sterilna pipeta (FALCON) – 50 ml
- Mehanska pipeta, EPPENDORF, 10-100 µl
- Centrifugirka 50 ml
- 12 kanalna mehanska pipeta, FINNPIPETTE, 50-300 µl
- 4 kanalna mehanska pipeta, TITERTEK, 100 µl
- Nastavki za pipete, STARLAB GMBH, 200 µl
- Petrijevka
- Papirnate brisače
- Etanol

Kemikalije:

- Gojišče za celice 2D9/A549 (z 2 % FCS)

- EMCV ($c = 1 \times 10^9$ pfu/ml)

Tretji dan je potrebno celicam, ki smo jih prejšnji dan tretirali z IFN, dodati primerno koncentracijo virusa. To naredimo tako, da najprej odlijemo gojišče iz ploščic ter njih površino osušimo s papirnato brisačo. Nato predhodno pripravljeno suspenzijo virusa EMCV v gojišču z 2 % serumom prenesemo k celicam. Tako dobimo multipliciteto infekcije s približno 1 plakotvorno enoto (pfu) na celico pri celicah 2D9, oziroma 2 pfu na celico pri celicah A549. Z multikanalno pipeto dodamo po 100 μ l suspenzije v vse jamice razen k pozitivnim kontrolam, to je k štirim jamicam v stolpcih 1 in 12, ki jih napolnimo z gojiščem brez virusa.

Ploščice s celicami ponovno vrnemo v inkubator. Celice 2D9 inkubiramo približno 24 ur, celice A549 pa približno 30 ur.

4. dan (določanje viabilnosti celic)

Materiali:

Laboratorijska oprema:

- Hladilnik
- Inkubator (100 % vlažnost, 5 % CO₂, 37°C)
- Invertni mikroskop
- Čitalec mikrotitrskih ploščic (ANTHOS HTLL)
- Računalnik

Pribor:

- Sterilne rokavice
- Plastične posode
- 12 kanalna mehanska pipeta, TITERTEK, 50-250 μ l
- Nastavki za pipete, STARLAB GMBH, 200 μ l
- Papirne brisače
- Etanol

Kemikalije:

- Fosfatni pufer s soljo (PBS)
- Rastopina amido črno (0,05 % amido črnega v 9 % očetni kislini z 0,1M natrijevim

acetatom)

- Raztopina za fiksiranje (10 % formalin v pufri očetne kisline in natrijevega acetata)
- Raztopina natrijevega hidroksida (0,1M NaOH)
- Raztopina natrijevega hipoklorita

Pred začetkom barvanja celic je potrebno pod mikroskopom preveriti virusne kontrole oziroma določiti približno jakost citopatskega učinka. Ko je v virusnih kontrolah dosežena okoli 95 % smrtnost celic, lahko pričnemo z barvanjem.

Najprej odlijemo gojišče iz ploščic v posodo z natrijevim hipokloritom in nato ploščice osušimo s papirnato brisačo prepojeno z etanolom. Za spiranje ostankov gojišča sledi dodajanje po 150 µl PBS v vsako jamico z multikanalno pipeto. Ko smo ponovno odlili vsebino ploščic po zgoraj opisanem postopku dodajamo v vsako jamico po 150 µl barvila amido črno. Ploščice inkubiramo 30 minut pri sobni temperaturi in nato vsebino ponovno odlijemo v posodo natrijevim hipokloritom.

Naslednji korak je dodajanje po 150 µl raztopine za fiksacijo, ki jo zatem odlijemo, ploščice pa speremo pod vodnim curkom. Ploščice osušimo s papirnato brisačo in jih za 3 do 4 ure postavimo v toplo sobo, da se do konca posušijo.

Na koncu dodajamo po 150 µl 0,1M NaOH v vsako jamico, ploščice rahlo pretresemo in jih pustimo stati okoli 30 minut oziroma dokler se barvilo ne raztopi do konca.

S čitalcem ploščic v vsaki jamici izmerimo absorbanco pri 620 nm. Izmerjene vrednosti absorbance so sorazmerne s številom preživelih celic oziroma omogočajo določanje uspešnost IFN pri zmanjšanju citopatskega učinka virusa. Tako lahko primerjamo različne vzorce med seboj oziroma določamo relativno aktivnost vzorcev glede na standard.

Postopek izračuna specifičnih aktivnosti vzorcev je enak kot pri metodi RGA.

OPOMBA:

Obe metodi sta bili izvedeni v sterilnih pogojih, ki so bili zagotovljeni s stalnim pretokom sterilnega prefiltriranega zraka v laboratoriju, z delom v laminariju ter z uporabo sterilnega pribora in reagentov.

4 REZULTATI

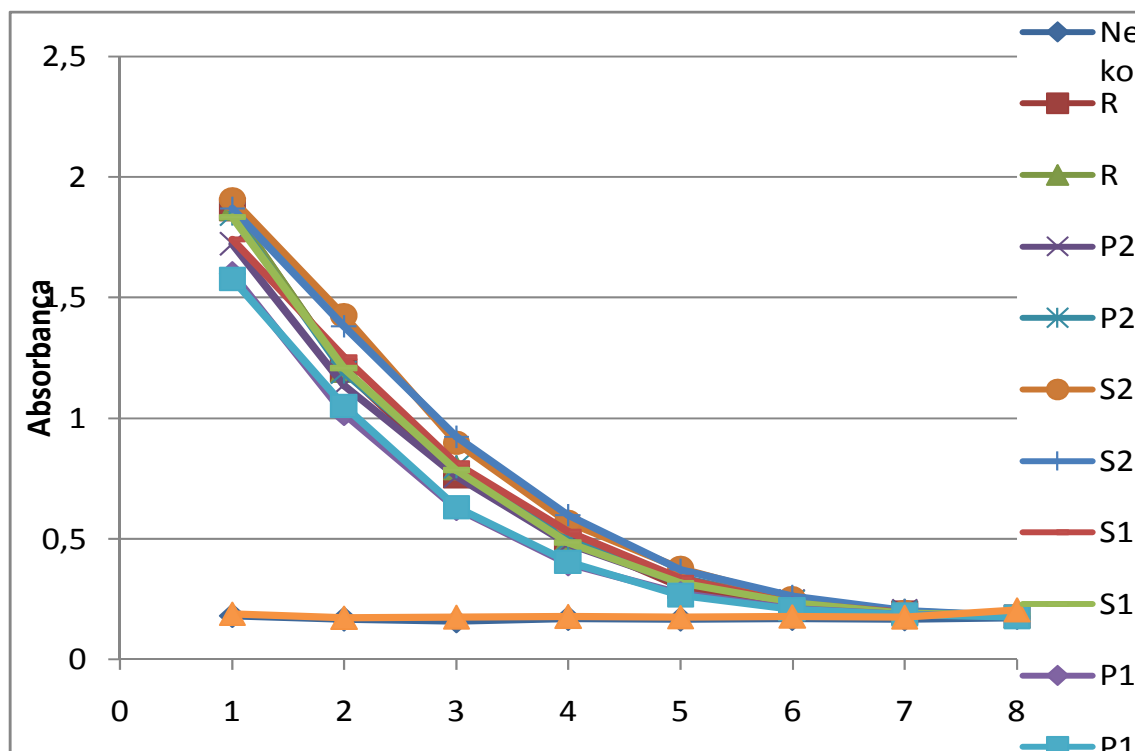
4.1 DOLOČANJE ABSORBANCE

Pri obeh metodah (AVA in RGA) smo rezultate pridobili z obdelavo izmerjenih absorbanc po tretiranju z vzorci in standardi. Pri metodi RGA smo pri 405 nm merili absorbanco rumeno obarvanega produkta, ki je nastal iz dodanega encimskega substrata p-NPP ob delovanju SEAP. Rezultate za metodo AVA smo pridobili z obdelavo absorbanc barvila amido črno pri 620 nm, kar je odražalo število preživelih celic po njihovem tretiranju z IFN in virusi. Izmerjene vrednosti smo ponazorili z grafi, ki odražajo odvisnost absorbanc od logaritma koncentracije uporabljenega IFN za vsako mikrotitrsko ploščico.

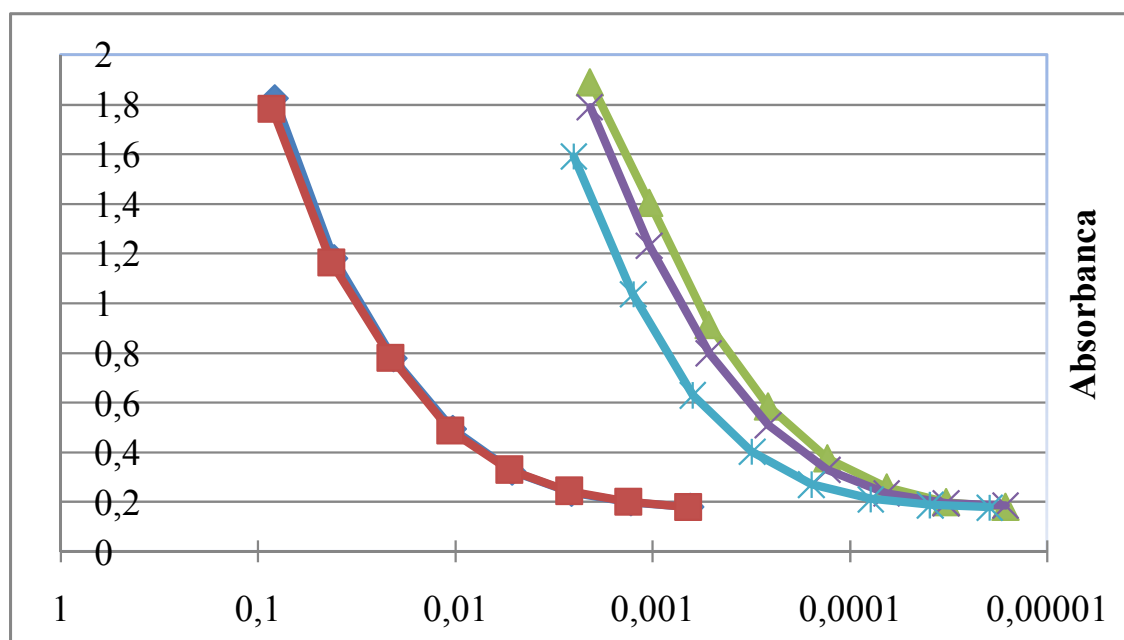
4.1.1 METODA RGA

Z metodo RGA smo na celicah HEK ISRE SEAP izvedli štiri neodvisne poskuse, pri katerih smo vsakič uporabili pet mikrotitrskih ploščic. Na vsaki ploščici so bili nanešeni vsi vzorci, njihova razporeditev, pa je bila različna, kot je opisano v poglavju 3.3. Z merjenjem absorbance v posameznih jamicah mikrotitrsko ploščice smo ugotovili odvisnost absorbance od redčitvenih stopenj vsakega interferonskega vzorca. To smo grafično ponazorili kot odvisnost absorbance od logaritmov koncentracij. V prvem in zadnjem stolpcu mikrotitrsko ploščice smo merili absorbanco v poljih brez dodanega IFN, kar predstavlja negativno kontrolo naših meritev. Da bi dobili ustrezen odziv celic, smo morali uporabiti zelo različne najvišje koncentracije vzorcev, faktor stopenjskega redčenja na ploščici pa je pri vseh vzorcih enak. Zato smo, zaradi poenostavitve na abscisni osi, v vseh grafičnih prikazih označili jamice s številkami od 1 do 8, ki hkrati predstavljajo dvojiško logaritemsko skalo, vendar pa vrednosti med vzorci niso primerljive.

Na sliki 7a je predstavljen tak primer grafične predstavitve odvisnosti absorbance od logaritma koncentracij, medtem ko so grafi ostalih meritev prikazani v prilogi. Slika 7b prikazuje absorbanco istih vzorcev na realni koncentracijski skali.



Slika 7a: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija HEK ISRE SEAP, poskus 1, ploščica 4)



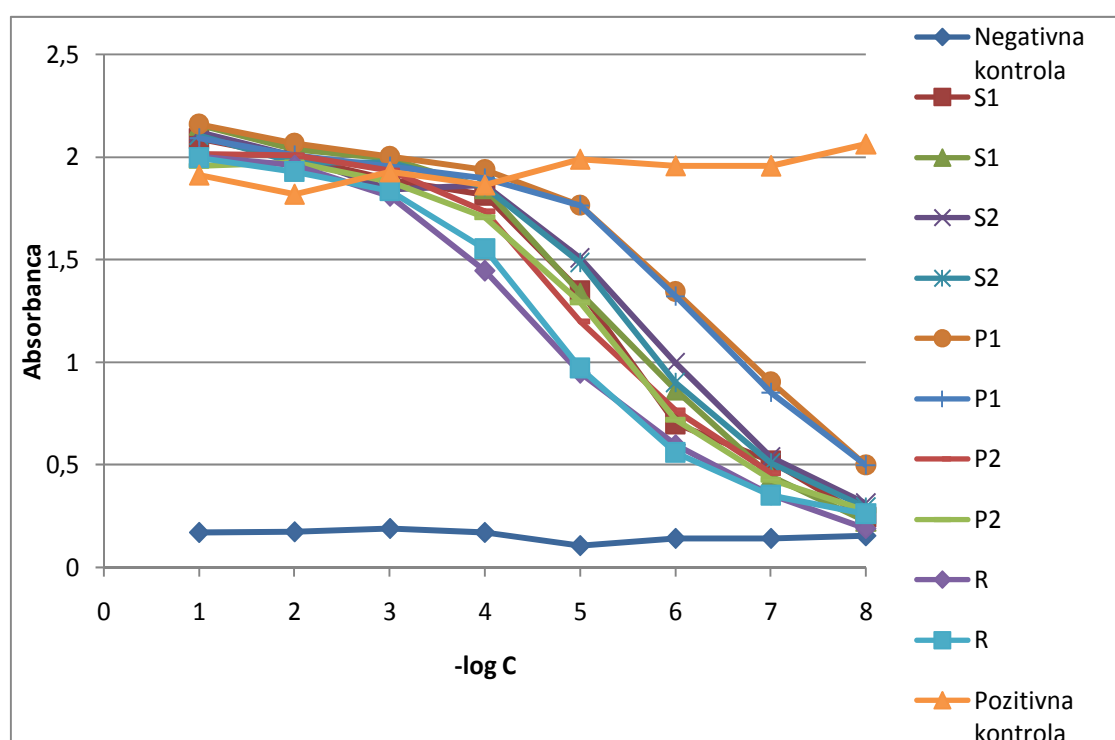
Slika 7b: Odvisnost absorbance od koncentracije (celična linija HEK ISRE SEAP, poskus 1, ploščica 4)

4.1.2 METODA AVA

Z metodo AVA smo izpeljali po tri neodvisne poskuse za vsako celično linijo (2D9 in

A549). Položaj posameznih vzorcev na petih mikrotitrskih ploščicah smo menjali enako kot pri metodi RGA. Tudi grafična predstavitev meritev je enaka kot pri metodi RGA, s to razliko, da smo tokrat v prvem in zadnjem stolpcu določali tako negativno (celice okužene z virusom, brez dodanega IFN), kot tudi pozitivno kontrolo (samo celice).

Spodnji grafikon (slika 8) prikazuje odvisnost absorbance od logaritmov koncentracij pri prvi ploščici izmerjeni na celični liniji 2D9. Meritve za ostale ploščice pri tej celični liniji, kot tudi meritve za celično linijo A549, so grafično predstavljene v prilogi.

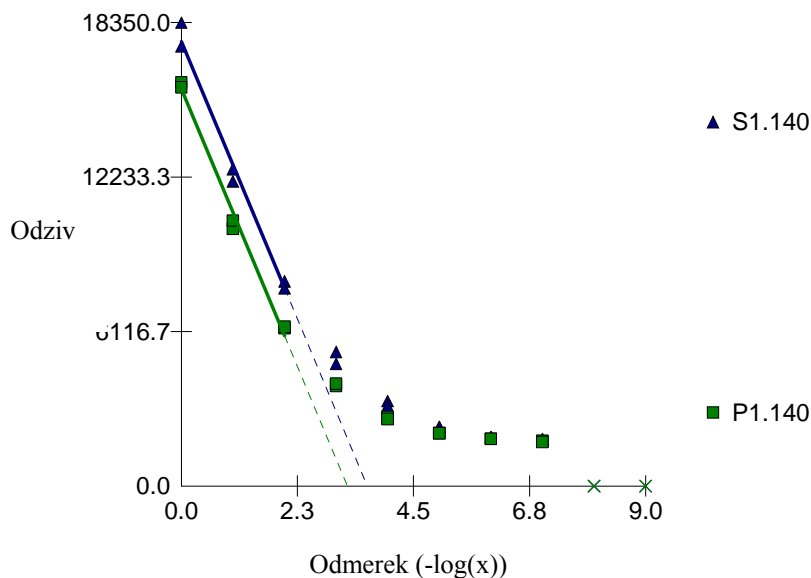


Slika 8: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija 2D9, poskus 1, ploščica 1)

4.2 IZRAČUN SPECIFIČNE AKTIVNOSTI VZORCEV

Za izračun specifične aktivnosti smo uporabili že omenjen računalniški programa PLA 1,2 (41), ki je iz lineranih odsekov krivulj odvisnosti absorbanc od logaritmov koncentracij narisal po pet vzporednih regresijskih premic za vsako izmerjeno mikrotitrsko ploščico.

Primer izrisa iz programa PLA je ponazorjen na spodnji sliki 9.



Slika 9: Vzoredni premici nastali s transformacijo iz linernih delov krivulj za standard S1 in vzorec P1 (celična linija HEK ISRE SEAP, poskus 1, ploščica 4)

Z upoštevanjem zamikov med posameznimi premicami po osi x program oceni relativno aktivnost posameznega vzorca glede na standard, oziroma razmerje aktivnosti vzorec/standard pri uporabljenih koncentracijah. Te podatke smo, skupaj s podatki o redčenjih vzorcev in standardov, bioloških aktivnostih standardov in koncentracijah vzorcev, uporabili za izračun specifične aktivnosti vzorcev napram različnim standardom. Pri izračunu smo si pomagali z računalniškim programom Excel, uporabili pa smo naslednjo enačbo:

$$SA(vz) = \frac{BA(st) \cdot R(vz) \cdot RA(vz)}{R(st) \cdot c(vz)}, \quad \text{kjer je}$$

SA = specifična aktivnost v IU/mg

BA = biološka aktivnost v IU/ml

RA = relativna aktivnost

R = redčenje

c = koncentracija v mg/ml

vz = vzorec

st = standard

Končni izračuni za posamezne celične linije so predstavljeni v preglednicah XVIII - XX. Podane so specifične aktivnosti vzorcev napram različnim standardom na posameznih ploščicah, izražene v mednarodnih enotah (z mednarodno kolaborativno študijo definirana količina določene snovi, ki povzroči določeni biološki učinek) na miligram vzorca (IU/mg), kot tudi njihova povprečja, standardne deviacije in koeficienti variacije.

Preglednica XVIII: Specifične aktivnosti (IU/mg) vzorcev glede na različne standarde izmerjene z metodo RGA na celični liniji HEK ISRE SEAP

vz/st	P1/S1	P1/S2	P1/R	P2/S1	P2/S2	P2/R	R/S1	R/S2	S2/S1
poskus 1									
ploščica 1	1,37E+08	2,18E+08	3,57E+07	3,54E+06	5,95E+06	9,25E+05	3,83E+06	6,46E+06	1,51E+08
ploščica 2	1,20E+08	1,61E+08	2,99E+07	3,41E+06	4,63E+06	8,19E+05	4,14E+06	5,85E+06	1,91E+08
ploščica 3	1,26E+08	2,01E+08	3,29E+07	3,63E+06	5,72E+06	9,42E+05	3,71E+06	5,92E+06	1,62E+08
ploščica 4	1,34E+08	2,00E+08	3,83E+07	3,17E+06	4,90E+06	9,42E+05	3,55E+06	5,37E+06	1,68E+08
ploščica 5	1,11E+08	1,70E+08	3,09E+07	2,79E+06	4,24E+06	8,21E+05	3,71E+06	5,74E+06	1,65E+08
povprečje	1,26E+08	1,90E+08	3,35E+07	3,31E+06	5,09E+06	8,90E+05	3,79E+06	5,87E+06	1,67E+08
st. dev.	1,07E+07	2,36E+07	3,47E+06	3,40E+05	7,25E+05	6,43E+04	2,21E+05	3,95E+05	1,46E+07
KV (%)	8,48	12,42	10,35	10,26	14,26	7,23	5,85	6,74	8,72
poskus 2									
ploščica 1	1,32E+08	1,87E+08	3,09E+07	3,68E+06	5,32E+06	8,38E+05	4,36E+06	6,46E+06	1,83E+08
ploščica 2	1,14E+08	1,58E+08	3,02E+07	3,48E+06	4,71E+06	8,90E+05	3,76E+06	5,17E+06	1,86E+08
ploščica 3	1,03E+08	2,20E+08	4,14E+07	3,31E+06	5,83E+06	1,05E+06	3,02E+06	5,53E+06	1,43E+08
ploščica 4	1,16E+08	1,64E+08	3,79E+07	2,80E+06	4,39E+06	9,13E+05	3,27E+06	4,84E+06	1,66E+08
ploščica 5	1,05E+08	1,66E+08	3,06E+07	2,70E+06	3,95E+06	7,81E+05	3,42E+06	5,08E+06	1,70E+08
povprečje	1,14E+08	1,79E+08	3,42E+07	3,19E+06	4,84E+06	8,94E+05	3,57E+06	5,42E+06	1,70E+08
st. dev.	1,15E+07	2,54E+07	5,14E+06	4,29E+05	7,47E+05	1,00E+05	5,17E+05	6,35E+05	1,69E+07
KV (%)	10,04	14,18	15,05	13,43	15,42	11,24	14,50	11,72	9,96
poskus 3									
ploščica 1	1,59E+08	2,44E+08	3,64E+07	3,65E+06	5,76E+06	8,51E+05	4,24E+06	6,62E+06	1,66E+08
ploščica 2	1,49E+08	2,16E+08	4,11E+07	3,63E+06	5,26E+06	1,01E+06	3,60E+06	5,26E+06	1,74E+08
ploščica 3	1,56E+08	2,56E+08	4,06E+07	3,60E+06	5,95E+06	1,07E+06	3,98E+06	5,57E+06	1,51E+08
ploščica 4	1,60E+08	2,41E+08	4,40E+07	3,40E+06	4,93E+06	1,04E+06	3,29E+06	5,56E+06	1,67E+08
ploščica 5	1,53E+08	2,36E+08	4,37E+07	3,38E+06	5,19E+06	9,73E+05	3,47E+06	5,36E+06	1,64E+08
povprečje	1,56E+08	2,39E+08	4,12E+07	3,53E+06	5,42E+06	9,88E+05	3,72E+06	5,67E+06	1,64E+08
st. dev.	4,52E+06	1,45E+07	3,05E+06	1,31E+05	4,24E+05	8,47E+04	3,87E+05	5,44E+05	8,49E+06
KV (%)	2,91	6,10	7,42	3,71	7,83	8,58	10,42	9,59	5,16
poskus 4									
ploščica 1	1,74E+08	2,56E+08	3,76E+07	4,16E+06	6,08E+06	9,14E+05	4,51E+06	6,03E+06	1,86E+08
ploščica 2	1,81E+08	1,91E+08	3,71E+07	4,05E+06	6,22E+06	9,79E+05	4,29E+06	5,12E+06	2,04E+08
ploščica 3	1,72E+08	2,38E+08	4,54E+07	4,16E+06	6,03E+06	1,09E+06	3,77E+06	6,04E+06	1,77E+08
ploščica 4	1,78E+08	2,45E+08	4,73E+07	3,88E+06	4,97E+06	9,90E+05	4,02E+06	5,11E+06	1,73E+08
ploščica 5	1,53E+08	2,16E+08	4,15E+07	3,39E+06	4,81E+06	8,96E+05	3,86E+06	5,27E+06	1,79E+08
povprečje	1,72E+08	2,29E+08	4,18E+07	3,93E+06	5,62E+06	9,74E+05	4,09E+06	5,51E+06	1,83E+08
st. dev.	1,07E+07	2,57E+07	4,55E+06	3,23E+05	6,72E+05	7,67E+04	3,06E+05	4,78E+05	1,22E+07
KV (%)	6,26	11,20	10,90	8,23	11,96	7,88	7,48	8,68	6,65
skupaj									
povprečje	1,42E+08	2,08E+08	3,91E+07	3,43E+06	5,23E+06	9,51E+05	3,64E+06	5,41E+06	1,69E+08
st. dev.	2,54E+07	3,28E+07	4,77E+06	4,80E+05	6,08E+05	2,92E+04	3,52E+05	4,48E+05	9,72E+06
KV (%)	17,89	15,77	12,22	13,97	11,62	3,07	9,67	8,29	5,75

Preglednica XIX: Specifične aktivnosti (IU/mg) vzorcev glede na različne standarde izmerjene z metodo AVA na celični liniji 2D9

vz/st	P1/S1	P1/S2	P1/R	P2/S1	P2/S2	P2/R	R/S1	R/S2	S2/S1
poskus 1									
ploščica 1	8,59E+07	1,33E+08	1,62E+08	7,61E+05	1,09E+06	1,35E+06	5,69E+05	7,78E+05	1,78E+08
ploščica 2	8,44E+07	1,42E+08	1,32E+08	7,94E+05	1,34E+06	1,22E+06	6,47E+05	1,08E+06	1,50E+08
ploščica 3	7,88E+07	1,17E+08	1,44E+08	5,83E+05	9,03E+05	1,06E+06	5,37E+05	8,35E+05	1,73E+08
ploščica 4	8,48E+07	1,38E+08	1,54E+08	9,06E+05	1,49E+06	1,68E+06	5,37E+05	8,87E+05	3,06E+08
ploščica 5	1,84E+08	1,78E+08	1,69E+08	1,50E+06	1,58E+06	1,50E+06	1,06E+06	1,07E+06	2,40E+08
povprečje	1,04E+08	1,42E+08	1,52E+08	9,08E+05	1,28E+06	1,36E+06	6,69E+05	9,30E+05	2,09E+08
st. dev.	4,50E+07	2,25E+07	1,45E+07	3,49E+05	2,82E+05	2,40E+05	2,20E+05	1,38E+05	6,37E+07
KV (%)	43,42	15,88	9,49	38,46	22,02	17,60	32,96	14,88	30,41
poskus 2									
ploščica 1	9,30E+07	1,29E+08	1,74E+08	9,20E+05	1,22E+06	1,68E+06	5,50E+05	7,47E+05	1,90E+08
ploščica 2	1,02E+08	1,62E+08	2,07E+08	9,93E+05	1,91E+06	1,95E+06	5,08E+05	8,51E+05	1,58E+08
ploščica 3	1,02E+08	1,10E+08	1,39E+08	1,04E+06	1,11E+06	1,42E+06	7,34E+05	7,45E+05	2,07E+08
ploščica 4	8,12E+07	1,21E+08	1,78E+08	8,54E+05	1,28E+06	1,98E+06	4,35E+05	6,52E+05	1,66E+08
ploščica 5	1,01E+08	1,68E+08	1,89E+08	1,30E+06	2,24E+06	2,49E+06	5,20E+05	8,66E+05	1,52E+08
povprečje	9,58E+07	1,38E+08	1,77E+08	1,02E+06	1,55E+06	1,90E+06	5,50E+05	7,72E+05	1,75E+08
st. dev.	9,03E+06	2,53E+07	2,48E+07	1,70E+05	4,96E+05	3,98E+05	1,12E+05	8,78E+04	2,33E+07
KV (%)	9,42	18,32	14,01	16,66	31,93	20,92	20,31	11,37	13,34
poskus 3									
ploščica 1	1,27E+08	2,55E+08	2,19E+08	1,20E+06	1,88E+06	2,48E+06	5,58E+05	1,13E+06	1,33E+08
ploščica 2	1,04E+08	1,63E+08	1,45E+08	1,17E+06	1,83E+06	1,63E+06	7,16E+05	1,12E+06	1,60E+08
ploščica 3	1,33E+08	1,72E+08	2,16E+08	1,00E+06	1,36E+06	1,71E+06	5,72E+05	7,94E+05	1,83E+08
ploščica 4	9,32E+07	1,47E+08	1,70E+08	9,89E+05	1,50E+06	1,95E+06	5,61E+05	8,33E+05	1,65E+08
ploščica 5	1,44E+08	2,32E+08	1,94E+08	1,24E+06	2,02E+06	1,72E+06	9,19E+05	1,30E+06	1,51E+08
povprečje	1,20E+08	1,94E+08	1,89E+08	1,12E+06	1,72E+06	1,90E+06	6,65E+05	1,04E+06	1,58E+08
st. dev.	2,10E+07	4,71E+07	3,18E+07	1,17E+05	2,77E+05	3,45E+05	1,56E+05	2,15E+05	1,83E+07
KV (%)	17,46	24,30	16,84	10,43	16,14	18,18	23,51	20,80	11,58
skupaj									
povprečje	1,07E+08	1,58E+08	1,73E+08	1,02E+06	1,52E+06	1,72E+06	6,28E+05	9,13E+05	1,81E+08
st. dev.	1,24E+07	3,13E+07	1,87E+07	1,06E+05	2,20E+05	3,11E+05	6,79E+04	1,33E+05	2,60E+07
KV (%)	11,64	19,82	10,79	10,45	14,51	18,09	10,82	14,55	14,39

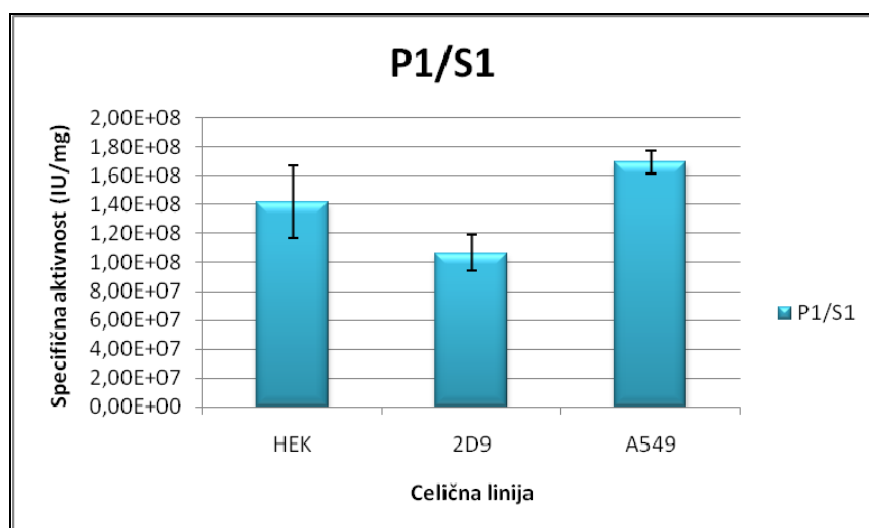
Preglednica XX: Specifične aktivnosti (IU/mg) vzorcev glede na različne standarde izmerjene z metodo AVA na celični liniji A549

vz/st	P1/S1	P1/S2	P1/R	P2/S1	P2/S2	P2/R	R/S1	R/S2	S2/S1
poskus 1									
ploščica 1	1,00E+08	1,82E+08	6,13E+07	1,30E+06	2,22E+06	8,37E+05	1,63E+06	2,78E+06	1,47E+08
ploščica 2	1,42E+08	1,40E+08	6,19E+07	1,95E+06	1,77E+06	8,18E+05	2,42E+06	2,43E+06	2,61E+08
ploščica 3	1,34E+08	1,90E+08	9,04E+07	1,70E+06	2,50E+06	1,11E+06	1,53E+06	2,30E+06	1,71E+08
ploščica 4	1,69E+08	2,04E+08	1,15E+08	2,04E+06	2,51E+06	1,35E+06	1,47E+06	1,98E+06	2,00E+08
ploščica 5	3,47E+08	3,84E+08	1,70E+08	3,57E+06	4,53E+06	1,78E+06	2,13E+06	2,22E+06	2,41E+08
povprečje	1,78E+08	2,20E+08	9,99E+07	2,11E+06	2,71E+06	1,18E+06	1,84E+06	2,34E+06	2,04E+08
st. dev.	9,75E+07	9,49E+07	4,54E+07	8,67E+05	1,06E+06	4,00E+05	4,15E+05	2,94E+05	4,76E+07
KV (%)	54,67	43,08	45,46	41,08	39,28	33,92	22,63	12,58	23,33
poskus 2									
ploščica 1	2,06E+08	2,47E+08	1,04E+08	3,10E+06	3,77E+06	1,64E+06	1,87E+06	2,32E+06	2,00E+08
ploščica 2	1,57E+08	3,65E+08	1,27E+08	2,32E+06	5,87E+06	2,11E+06	1,24E+06	2,77E+06	1,08E+08
ploščica 3	1,47E+08	2,10E+08	9,82E+07	2,31E+06	3,41E+06	1,58E+06	1,48E+06	2,19E+06	1,70E+08
ploščica 4	1,30E+08	1,60E+08	6,90E+07	2,83E+06	3,52E+06	1,67E+06	1,68E+06	2,12E+06	1,98E+08
ploščica 5	1,75E+08	2,21E+08	1,05E+08	3,01E+06	3,71E+06	1,82E+06	1,47E+06	1,93E+06	1,98E+08
povprečje	1,63E+08	2,41E+08	1,00E+08	2,71E+06	4,06E+06	1,76E+06	1,55E+06	2,27E+06	1,75E+08
st. dev.	2,91E+07	7,63E+07	2,06E+07	3,76E+05	1,03E+06	2,12E+05	2,39E+05	3,16E+05	3,93E+07
KV (%)	17,86	31,66	20,54	13,85	25,29	12,05	15,44	13,94	22,49
poskus 3									
ploščica 1	1,98E+08	2,65E+08	1,06E+08	3,19E+06	4,05E+06	1,68E+06	1,89E+06	2,51E+06	1,91E+08
ploščica 2	1,59E+08	2,75E+08	9,98E+07	2,48E+06	4,40E+06	1,62E+06	1,58E+06	2,72E+06	1,45E+08
ploščica 3	1,39E+08	2,68E+08	1,03E+08	1,98E+06	3,92E+06	1,51E+06	1,30E+06	2,56E+06	1,35E+08
ploščica 4	1,92E+08	2,33E+08	1,02E+08	2,74E+06	3,22E+06	1,44E+06	1,86E+06	2,21E+06	2,09E+08
ploščica 5	1,49E+08	2,18E+08	1,08E+08	2,69E+06	3,91E+06	2,01E+06	1,35E+06	1,91E+06	1,78E+08
povprečje	1,67E+08	2,52E+08	1,04E+08	2,62E+06	3,90E+06	1,65E+06	1,60E+06	2,38E+06	1,71E+08
st. dev.	2,65E+07	2,50E+07	3,09E+06	4,38E+05	4,28E+05	2,20E+05	2,76E+05	3,21E+05	3,11E+07
KV (%)	15,81	9,95	2,98	16,74	10,98	13,30	17,30	13,47	18,12
skupaj									
povprečje	1,70E+08	2,38E+08	1,01E+08	2,48E+06	3,55E+06	1,53E+06	1,66E+06	2,33E+06	1,83E+08
st. dev.	7,88E+06	1,59E+07	2,02E+06	3,25E+05	7,39E+05	3,10E+05	1,55E+05	5,79E+04	1,79E+07
KV (%)	4,65	6,71	2,00	13,11	20,79	20,26	9,31	2,48	9,76

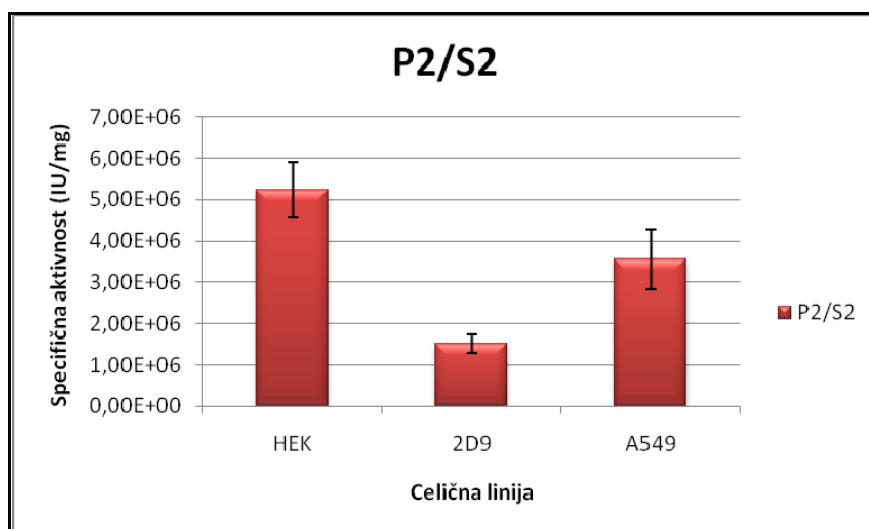
Primerjava izračunanih povprečnih specifičnih aktivnosti za štiri različne pare vzorcev / standard za vse tri celične linije je ponazorjena v spodnji preglednici in nato še grafično v obliki stolpcičnih diagramov (slike 10 - 13).

Preglednica XXI: Primerjava specifičnih aktivnosti (IU/mg) za različne pare vzorec/standard, pridobljenih na različnih celičnih linijah

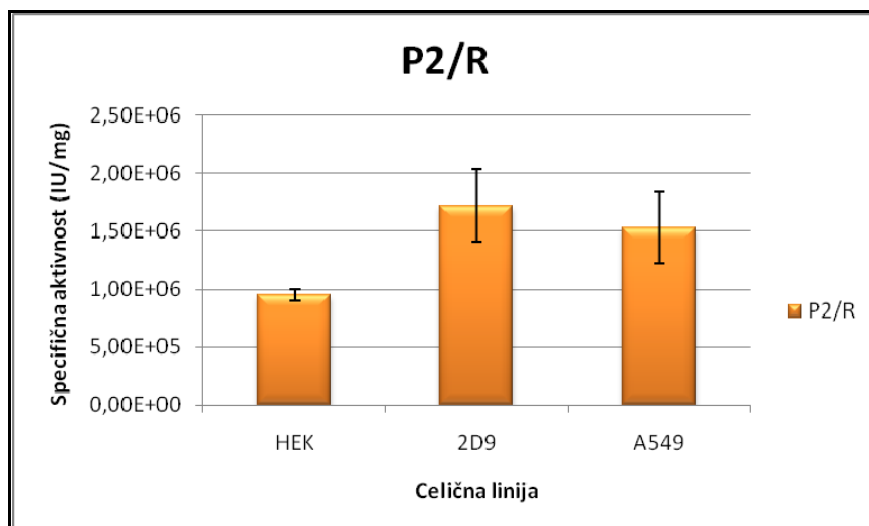
par vzorec/standard	P1/S1	P2/S2	P2/R	S2/S1
celična linija				
HEK	1,42E+08	5,23E+06	9,51E+05	1,69E+08
2D9	1,07E+08	1,52E+06	1,72E+06	1,81E+08
A549	1,70E+08	3,55E+06	1,53E+06	1,83E+08



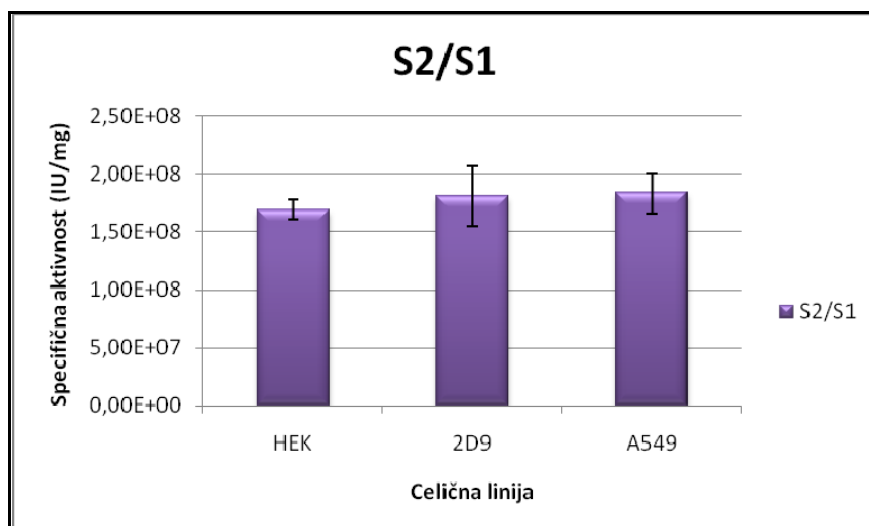
Slika 10: Primerjava specifične aktivnosti vzorca P1 proti standardu S1 pri treh celičnih linijah



Slika 11: Primerjava specifične aktivnosti vzorca P2 proti standardu S2 pri treh celičnih linijah



Slika 12: Primerjava specifične aktivnosti vzorca P2 proti standardu R pri treh celičnih linijah



Slika 13: Primerjava specifične aktivnosti standarda S2 proti standardu S1 pri treh celičnih linijah

Meritve na treh celičnih linijah so torej pokazale enake relativne aktivnosti nepegiliranih interferonov, medtem ko so bili odzivi pegiliranih oblik zelo odvisni od uporabljene celične linije oziroma metode merjenja.

Splošna ugotovitev o različnem odzivu pegiliranih IFN, pri različnih postavitvah poskusa še ne ugotavlja nobene zakonitosti kot tudi ne signifikantnosti teh razlik. Zato smo v naslednjem koraku izračunali razmerja aktivnosti med celičnimi linijami za vsak par vzorec/standard. V spodnji preglednici (preglednica XXII) so podana razmerja specifičnih aktivnosti izmerjenih z dvema celičnima linijama.

Preglednica XXII: Pregled razmerij specifičnih aktivnosti izmerjenih na različnih celičnih linijah

vz/st	P1/S1	P1/S2	P1/R	P2/S1	P2/S2	P2/R	R/S1	R/S2	S2/S1
celični liniji									
HEK:2D9	1,33	1,33	0,22	3,43	3,46	0,54	6,04	6,15	0,95
HEK:A549	0,84	0,88	0,37	1,41	1,48	0,61	2,28	2,41	0,93
A549:2D9	1,59	1,51	0,59	2,44	2,34	0,89	2,64	2,55	1,01

4.3 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Za ugotavljanje statistično značilne podobnosti, oziroma različnosti med aktivnostmi izmerjenimi s posameznimi celičnimi linijami, smo napravili statistično analizo izračunanih vrednosti in sicer s pomočjo statističnega programa SPSS.

Vsako skupino vrednosti specifične aktivnosti, ki se nanaša na posamezen par vzorec / standard, smo, glede na celično linijo, razdelili v tri podskupine.

Nato smo s testom Kolmogorov – Smirnov ugotavljali normalnost porazdelitve za vsako skupino podatkov izhajajoči iz naslednjih hipotez:

H_0 : Vzorci imajo normalno porazdelitev pri stopnji tveganja $\alpha = 0,05$.

H_1 : Vzorci nimajo normalne porazdelitve pri stopnji tveganja $\alpha = 0,05$.

Na osnovi porazdelitve meritev v vsaki skupini smo se odločili za izbiro testa, s katerim smo nato določali podobnost med podatki za vsako celično linijo. Izbrana testa, ANOVA pri normalnih porazdelitvah in Kruskal – Wallis-ov test za ostale primere, sta temeljila na naslednjih hipotezah:

H_0 : Vzorci so značilno podobni pri stopnji tveganja $\alpha = 0,05$

H_1 : Vzorci so značilno različni pri stopnji tveganja $\alpha = 0,05$

Glede na to, da uporabljena testa ugotavljata le statistično značilno podobnost ali različnost med skupinami vzorcev, ne določata pa skupine na katere se ta razlika nanaša, smo se odločili za dodatna testa, s katerima smo preizkušali podobnost za posamezni skupini podatkov.

Rezultati statističnih testov so predstavljeni v preglednici XXIII. Vzorci, za katere smo dokazali statistično značilno različnost so označeni z zvezdico.

Preglednica XXIII: Pregled rezultatov statističnih testov

Vzorec / standard	Porazdelitev	Izbrani test	α	p	Sprejeta hipoteza	Dodatni test	Določanje različnosti
P1/S1	nenormalna	Kruskal-Wallis	0,05	0,000	H_1	Mann-Whitney	HEK – 2D9* HEK – A549 2D9 – A549*
P1/S2	normalna	ANOVA	0,05	0,000	H_1	LSD	HEK – 2D9* HEK – A549 2D9 – A549*
P1/R	normalna	ANOVA	0,05	0,000	H_1	LSD	HEK – 2D9* HEK – A549* 2D9 – A549*
P2/S1	normalna	ANOVA	0,05	0,000	H_1	LSD	HEK – 2D9* HEK – A549* 2D9 – A549*
P2/S2	normalna	ANOVA	0,05	0,000	H_1	LSD	HEK – 2D9* HEK – A549* 2D9 – A549*
P2/R	normalna	ANOVA	0,05	0,000	H_1	LSD	HEK – 2D9* HEK – A549* 2D9 – A549
R/S1	nenormalna	Kruskal-Wallis	0,05	0,000	H_1	Mann-Whitney	HEK – 2D9* HEK – A549* 2D9 – A549*
R/S2	normalna	ANOVA	0,05	0,000	H_1	LSD	HEK – 2D9* HEK – A549* 2D9 – A549*
S2/S1	normalna	ANOVA	0,05	0,527	H_0		

5 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo primerjali dve različni metodi za določanje biološke aktivnosti IFN »in vitro« s poudarkom na ugotavljanju primerljivosti izmerjenih bioloških aktivnosti pegiliranih oblik IFN. Obe uporabljeni metodi temeljita na tretiranju celičnih kultur z biološko aktivnim IFN ter posrednim ugotavljanjem njegove aktivnosti z merjenjem odziva celic.

Metoda AVA je bila izvedena na dveh celičnih linijah, 2D9 in A549, in sicer s tremi neodvisnimi poskusi za vsako linijo, medtem ko je bila metoda RGA izvajana na celični liniji HEK ISRE SEAP s štirimi neodvisnimi poskusi.

Poskus smo pri vsaki celični liniji zastavili na primerljiv način. Vsakič smo namreč uporabili po pet mikrotitrskih ploščic, na katerih so bili isti vzorci IFN. Položaj vzorcev oziroma standardov je bil spremenjen na vsaki ploščici, da se izognemo morebitnim pozicijskim vplivom na izmerjene vrednosti.

Biološke aktivnosti dveh pegiliranih vzorcev P1 (PegIFN- α 2b) in P2 (PegIFN- α 2a) smo ovrednotili primerjalno, glede na odzive standardov v enakih pogojih. Uporabili smo tri standarde s preliminarno določenimi biološkimi aktivnostmi in sicer dva nepegilirana standarda S1 (IFN- α 2b) in S2 (IFN- α 2a) ter en pegilirani standard (PegIFN- α 2a).

Rezultate naših poskusov predstavljajo meritve absorbance, ki pri metodi RGA odražajo količino izločene SEAP, nastale kot posledica pod vplivom IFN izraženega odgovarjajočega poročevalnega gena. Po drugi strani pa absorbanca, izmerjena pri metodi AVA, predstavlja število z EMC virusom okuženih celic, ki so preživele zaradi protivirusnega učinka IFN.

Meritve absorbanc dvokratnih zaporednih redčenj za vsak vzorec oziroma standard smo predstavili v obliki krivulj odvisnosti absorbance od logaritmov koncentracije (sliki 7, 8 in priloga). Omenjeni diagrami nam omogočajo grafično oceno relativnih aktivnosti vzorcev glede na standarde pri uporabljenih koncentracijah. Tako premik posamezne krivulje desno, v smeri nižjih koncentracij, pomeni tudi višjo relativno aktivnost tega vzorca.

Pri vsakem testu smo določali tudi absorbanco kontrolnih vzorcev, kar nam je omogočilo določanje ozadja oziroma minimuma meritev, pri metodi AVA pa tudi maksimuma in s tem potrditev pravilno izbranega koncentracijskega območja za vzorce in standarde. Pri

celični liniji HEK ISRE SEAP nismo dosegli maksimuma odziva zaradi nižje odzivnosti te celične linije oziroma metode in pa zaradi relativno nizkih količin IFN, ki so na voljo v ampulah mednarodnega standarda.

Po medsebojni primerjavi krivulj metod RGA in AVA takoj opazimo pravilnejšo obliko krivulj pri prvi metodi, kar kaže na manjšo variabilnost oziroma večjo natančnost v primerjavi z metodo AVA. Glede na to, da sta metodi izvajani v dveh različnih laboratorijih z uporabo različnih priborov in aparaturo, ne moremo izključiti tudi vpliva teh dejavnikov na različno variabilnost rezultatov. Vendarle se zdi večja variabilnost v večji meri posledica same analizne metode AVA, tako glede na podobne ugotovitve v prejšnjih raziskavah (30) in pa glede na dejstvo, da je proticitopatični učinek, ki ga zasledujemo pri AVA posledica delovanja množice genov (18), pri metodi RGA pa merimo odzive enega gena, katerega regulacija je precej preprostejša.

Drugi pomemben premislek, ki izhaja iz omenjenih krivulj, je razlika v razponih krivulj pri eni in drugi metodi. Pri metodi AVA namreč opažamo celoten potek sigmoidne krivulje, vključno s spodnjim in zgornjim platojem, medtem ko pri krivuljah metode RGA zgornji plato ni bil dosežen, čeprav so uporabljene koncentracije vzorcev in standardov pri metodi RGA tudi 200-300 krat višje kot pri metodi AVA. Iz tega je razvidna večja občutljivost AVA v primerjavi z RGA, saj za odzivnost celic zadostujejo precej nižje koncentracije IFN. Hkrati pa to terja več predstopenj redčenja vzorcev IFN pri izvedbi meritev kar lahko dodatno prispeva k napaki merjenja.

Primerjava krivulj na vsakem posameznem grafu, pokaže njihovo medsebojno vzporednost, ne glede na pegiliranost ali nepegiliranost vzorcev. Vzporednost krivulj bi lahko razložili z enakim mehanizmom odziva celic na pegilirane in nepegilirane IFN.

Prav zgoraj omenjeno dejstvo o vzporednosti odsekov krivulj, ki ponazarjajo odvisnosti odziva celic od logaritma koncentracije IFN, nam je omogočilo analizo pridobljenih rezultatov s pomočjo računalniškega programa PLA 1,2. S programom smo določili relativne aktivnosti vsakega vzorca napram trem standardom in sicer za meritve pridobljene za vsako mikrotitrsko ploščico posebej. Za veljavnost vsakega testa je bila nujna izpolnitev dveh pogojev in sicer obstoj linearnega dela krivulje, ki ga program opiše s premico ter vzporednost teh delov (premic) pri vzorcu in standardu (slika 9). Na ta način lahko program izračuna relativno aktivnost vsakega vzorca glede na izbrani standard.

S pomočjo računalniškega programa Excel smo iz pridobljenih podatkov, skupaj z že znanimi podatki o redčenjih in koncentracijah vzorcev in standardov ter aktivnostih standardov, izračunali biološke aktivnosti in nato še specifične aktivnosti obeh vzorcev napram različnim standardom. Slednje se nanašajo na aktivnost masne enote vzorca in so zato odvisne od njegove koncentracije. Končni izračuni za vsako celično linijo so predstavljeni v razpredelnicah XVIII - XX.

Podali smo specifične aktivnosti, ki smo jih izračunali relativno na različne standarde z namenom pridobivanja čim večjega števila vrednosti za lažjo medsebojno primerjavo različnih celičnih linij in različnih metod kot tudi močnejšega statističnega dokaza hipoteze v nadaljni statistični obdelavi rezultatov.

Molekuli IFN- α 2a in IFN- α 2b se med seboj razlikujeta v eni aminokislini. Molekuli sta sicer različni, vendar je njuno delovanje v tolikšni meri primerljivo, da se je ohranilo medsebojno razmerje izmerjene aktivnosti ne glede na uporabljeno celično linijo oziroma metodo merjenja. Na osnovi tega smo opravili tudi navzkrižno vrednotenje ene pegilirane oblike napram drugemu standardu. Takšne meritve za oceno specifične aktivnosti niso relevantne, saj gre načeloma za dve različni molekuli, za kateri nimamo zadostnih dokazov za trditev, da delujeta popolnoma enako. V našem primeru pa so vrednosti predstavljale dodatne podatke za primerjavo metod in celičnih linij za testiranje interferonov.

Na ta način le pri primerjavi parov P1/S1, ki se nanašajo le na IFN- α 2b ter P2/S2, ki se nanašajo le na IFN- α 2a, lahko z določeno gotovostjo trdimo, da je vsaka razlika v izračunanih aktivnostih med posameznimi celičnimi linijami izključno posledica pegilacije.

Razpredelnice XVIII - XX prikazujejo izračunane specifične aktivnosti vzorcev izražene v mednarodnih enotah na mg vzorca za vseh pet ploščic pri vsakem izvedenem poskusu. V zbirnih vrsticah so podane tudi aritmetične sredine, standardne deviacije in koeficienti variacije za vsak poskus in skupno, za vse poskuse na eni celični liniji.

Očitna je razlika v koeficientih variacije ene in druge metode. Višje vrednosti pri metodi AVA namreč kažejo manjšo ponovljivost med ploščicami oziroma natančnost znotraj posameznega poskusa.

Če med seboj primerjamo vrednosti specifičnih aktivnosti vzorcev P1 in P2, ugotovimo, da je vzorec P1 aktivnejši. Razlika verjetno izhaja iz strukture polimera PEG. Pri molekuli P2 je njegovalna masa 40 KDa, kar verjetno močnejše moti interakcije konjugata IFN z receptorji na celični površini. V primerjavi s tem je inhibicija zaradi 12KDa verige PEG na

konjugatu P1 očitno manjša.

Razlike v izračunanih povprečnih aktivnosti so značilne tako med metodama samima kakor tudi med različnimi celičnimi linijami.

Pri primerjavi povprečnih specifičnih aktivnosti izmerjenih na dveh celičnih linijah z isto metodo AVA ugotovimo višje vrednosti pri celični liniji A549 kot pri liniji 2D9. Prav tako se specifične aktivnosti izmerjene z metodo RGA na celični liniji HEK ISRE SEAP precej razlikujejo od rezultatov pridobljenih na obeh celičnih linijah z metodo AVA.

Vzorca P1 in P2 smo nato določali še napram pegiliranemu standardu R. Pri vzorcu P2 smo dobili dokaj podobni vrednosti na celicah 2D9 in A549, medtem ko so vrednosti pridobljene z RGA nekoliko nižje. Po drugi strani so razlike v aktivnostih med celičnimi linijami pri vzorcu P1 še bolj izrazite, s tem da so tiste pri celicah HEK ISRE SEAP ponovno nižje od ostalih dveh.

Z relativno primerjavo aktivnosti nepegiliranih standardov S2 in S1, smo pokazali, da so rezultati pridobljeni z različnimi metodami in celičnimi linijami primerljivi, ko gre za nepegilirane oblike IFN. Standarda se strukturno sicer razlikujeta v eni AK vendar to očitno ne vpliva bistveno na njuno interakcijo z receptorjem. Pri vseh ostalih parih vzorec/standard take enotnosti ni bilo. Rahle razlike so vendarle prisotne, vendar jih na osnovi izmerjenega ne moremo z gotovostjo pripisati vplivu strukturne razlike med IFN- α 2a in IFN- α 2b ali vplivu naključnih dejavnikov.

Za nazornejšo primerjavo rezultatov med tremi celičnimi linijami smo grafično predstavili rezultate štirih parov vzorec/standard, ki najbolje prikazujejo odvisnost izmerjene biološke aktivnosti od metode in izbrane celične linije. Prikazali smo jih v obliki stolpičnih diagramov (slike 10 - 13). Para P1/S1 in P2/S2 ponazarjata primerjavo dveh parov identičnih proteinov, od katerih je eden pegiliran, primerjava P2/R se nanaša na dve pegilirani molekuli IFN- α 2a, par S2/S1 pa smo izbrali iz že omenjenega razloga. Grafične predstavitve očitno pokažejo, razlike med posameznimi celičnimi linijami za pegilirane IFN. Pri paru S2/S1 pa je ravno tako opazna precejšnja podobnost v vseh treh primerih.

Tudi pri primerjavi z literaturnimi podatki o specifičnih aktivnostih vzorcev terapevtskih pegiliranih IFN P1 in P2 (21) (26), ki so bili izmerjeni na celičnih linijah, različnih od tistih, ki smo jih uporabljali sami, opazamo značilne razlike, kar govori v prid naši ugotovitvi.

Po ugotovitvi o različnem odzivu celic na pegilirane IFN smo preučevali morebitne zakonitosti teh razlik (preglednica XXII). Določali smo torej razmerja ocen specifičnih aktivnosti, ki smo jih izmerili s posameznimi celičnimi linijami. Iz razpredelnice je razvidno, da je med izračunanimi razmerji prisotna določena kovarianca. Faktorji razmerja, ki se nanašajo na pare vzorec P1/nepegilirani standard (v razpredelnici obarvano v modro), vzorec P2/nepegilirani standard (rdeče) ter pegilirani standard/nepegilirani standard (zeleno), kažejo značilno podobnost ne glede na to kateri celični liniji primerjamo med seboj. Očitno je tudi, da so razmerja pri vzorcu P2 večja kot pri vzorcu P1 in manjši kot pri pegiliranem standardu.

Za statistično vrednotenje naših ugotovitev, smo s statističnimi testi primerjali med seboj vrednosti specifičnih aktivnosti, ki smo jih izmerili s tremi celičnimi linijami. Razlike smo ovrednotili za vsak par vzorec/standard.

Pomagali smo si z računalniškim programom za statistično obdelavo podatkov SPSS, v katerem smo najprej preverjali normalnost porazdelitve preiskovanih parametrov. Glede na rezultate teh preizkušanj smo se nato lahko odločili za izbiro nadaljnjih testov in sicer za test ANOVA pri vzorcih, ki so bili porazdeljeni normalno ter Kruskal-Wallisov test za vzorce, katerih porazdelitev ni bila normalna. V obeh primerih smo pridobljeno vrednost statističnega parametra p primerjali z vrednostjo parametra α . Ker je bila le-ta pri vseh parih, razen pri paru S2/S1, višja od izračunanega parametra p , lahko ničelno hipotezo o značilni podobnosti naših vzorcev v teh primerih zavržemo. Iz tega sklepamo, da je hipoteza o značilni različnosti preiskovanih vzorcev pri pet odstotni stopnji tveganja veljavna oziroma, da je variabilnost med tremi preiskovanimi vzorci večja od variabilnosti znotraj vsakega posameznega vzorca. Preostalo nam je še ugotoviti na katere skupine vzorcev se omenjene razlike nanašajo, kar smo ugotavljali z dodatnima testoma LSD in Man-Whitney, ki sta primerjala po dva vzorca oziroma po dve celični liniji med seboj. Pari vzorcev pri katerih je bila stopnja različnosti signifikantna so v preglednici XXIII označeni z zvezdico (*).

Glede na to, da so v večini primerov razlike prisotne, lahko sklepamo, da so vsi trije vzorci med seboj značilno različni. Nasprotno temu je pri paru S2/S1 dokazana značilna podobnost med specifičnimi aktivnostmi izmerjenimi na treh različnih celičnih linijah, s čimer smo tudi potrdili predhodno omenjena predvidevanja.

Če torej povzamemo naše ugotovitve lahko rečemo, da smo pri določanju specifičnih aktivnosti pegiliranih IFN dobili različne rezultate tako glede na uporabljeno metodo kakor tudi v odvisnosti od celične linije. Iz tega je evidentno, da spoznanje o zamenljivosti metod AVA in RGA pri določanju biološke aktivnosti IFN (Caserman in sodelavci, 2006) ni prenosljivo na njihove pegilirane analoge. Povedano drugače, pridobljeni rezultati niso v skladu z našimi predvidevanji, oziroma nakazujejo na neveljavnost prvotno postavljene hipoteze. Pri tem so nedvomno pomembni tudi izsledki analize, ki se nanaša na medsebojno primerjavo aktivnosti nepegiliranih standardov IFN. Značilna podobnost med rezultati izmerjenimi na vseh treh celičnih linijah govori namreč v prid v predhodnih raziskavah že potrjeni istovetnosti metod AVA in RGA pri določanju aktivnosti nepegiliranih oblik. S tem lahko tudi posredno sklepamo o zanesljivosti naših raziskav, kar rezultatom daje dodatno težo.

Z določeno gotovostjo lahko torej trdimo, da je izmerjena aktivnost pegiliranega IFN odvisna ne samo od uporabljene metode, temveč tudi od celične linije, na kateri se metoda izvaja ter od izbranega standarda.

Po drugi strani pa je le z razpoložljivimi podatki zelo težko razlagati mehanizem omenjenih pojavov. Dejstvo je, da veriga PEG povzroča od celične linije odvisen vpliv na celični odgovor, kar je vzrok za premik krivulj odvisnosti odziva od logaritma koncentracij in posledično razliko v izmerjenjih aktivnostih. Razloge bi lahko iskali v različni izpostavljenosti receptorjev na celični površini pri različnih celicah. Hipotetično je možna večja dovzetnost sicer enakih receptorjev za vezavo IFN α -2 pri različnih celičnih linijah zaradi ovir iz neposredne sosesčine.

Čeprav rezultati nakazujejo na te možnosti, so zgornji zaključki zaenkrat le predpostavke, saj bi bilo za njihovo potrjevanje potrebnih veliko dodatnih raziskav. Zanimiva bi bila tudi primerjava števila in dolžine polietilenskih verig in kvantifikacija stopnje vezave na receptor. Vsekakor pa rezultati predstavljajo zelo zanimivo, če že ne tudi nujno področje raziskav, saj trenutno ne obstaja način za zanesljivo vrednotenje aktivnosti pegiliranih oblik IFN. To pa kliče po podrobnejši preučitvi metod za določanje biološke aktivnosti tudi ostalih pegiliranih proteinskih terapevtikov.

Tudi dodatni testi, ki smo jih izvedli z metodo RGA na celični liniji A549 93D7 so potrdili vse do sedaj omenjene sklepe. Rezultate ne navajamo saj niso bili preverjeni v več neodvisnih poskusih. Zanimivo je predvsem to, da čeprav je uporabljena celična linija

nastala s transfekcijo linije A549 z reporterskim genom, nismo opazili nobene podobnosti med aktivnostmi izmerjenimi na teh dveh celičnih linijah.

Na koncu naj povdarimo, da, ne glede na neznane razloge ugotovljenih razlik, kot tudi nedefinirane zakonitosti njihovega pojavljanja, navedeni rezultati odstirajo izjemno pomembno spoznanje. o zelo aktualnem in očitno še ne dovolj raziskanem področju druge generacije bioterapevtikov. Nakazujejo namreč vprašljivost referenčne metode za določanje njihove biološke aktivnosti. Čeprav je metoda AVA določena kot farmakopejska referenčna metoda, naši rezultati govorijo v prid nekonsistentnosti rezultatov pridobljenih znotraj te metode, odvisno od izbrane celične linije, in s tem tudi o nezanesljivosti na takšen način pridobljenih podatkov.

6 SKLEP

V diplomski nalogi smo primerjali dve metodi za določanje biološke aktivnosti IFN »in vitro« in sicer metodi RGA in AVA. Pri tem smo izhajali iz predhodno dokazane trditve o enakovrednosti teh metod pri določanju nepegiliranih IFN ter predpostavke o njeni veljavnosti tudi v primeru pegiliranih oblik.

Proti pričakovanjem naši rezultati kažejo na neprimerljivost metod pri določanju aktivnosti pegiliranih IFN ter s tem zavračajo prvotno postavljeno hipotezo. Verjetno je še pomembnejši dokaz nekonsistentnosti znotraj same metode AVA v primeru izvedbe na dveh različnih celičnih linijah.

Poleg tega so naši rezultati tudi potrdili v predhodnih raziskavah ugotovljeno zakonitost o zamenljivostih dveh metod, ko gre za določanje aktivnosti nepegiliranih IFN. Prav tako smo ponovno pokazali manjšo variabilnost rezultatov oziroma boljše natančnost znotraj posameznega poskusa pri metodi RGA kot pri metodi AVA, medtem ko se je metoda AVA ponovno izkazala za bolj občutljivo. Izpostavili bi tudi večjo sprejemljivost metode RGA z vidika cene in varnosti pri delu, saj je pri metodi AVA tveganje za operaterja nekoliko večje zaradi uporabe virusov.

Ob primerjavi izmerjenih aktivnosti dveh pegiliranih vzorcev IFN smo skladno z navedbami v literaturi opazili, da aktivnost pada z velikostjo konjugirane PEG verige. Tako smo izmerili višjo specifično aktivnost vzorca pegiliranega IFN α -2b (12 kDa PEG) kot pegiliranega IFN α -2a (40 kDa PEG). Slednje se, kot posledica večje PEG verige pri IFN α -2a, razlaga z bolj izraženim steričnim oviranjem interakcij med IFN in receptorjem.

Naši rezultati so torej močan dokaz statistično značilnih razlik med metodama AVA in RGA pri določanju specifične aktivnosti pegiliranih IFN. Sami razlogi različnega obnašanja pegiliranih IFN v primerjavi z nepegiliranimi zaenkrat ostajajo neznani. Zagotovo pa predstavljajo zanimivo nišo za nadaljnje raziskave interakcij IFN in njihovih konjugatov s celičnimi receptorji in sproženega celičnega odziva. Rezultati, ki smo jih pridobili s primerjavo dveh celičnih linij znotraj metode AVA, nakazujejo na potrebo po bolj natančnem definiranju referenčne metode za »in vitro« testiranje bioloških aktivnosti pegiliranih IFN. Uvedba novih standardov za pegilirane oblike se zdi na prvi pogled privlačna rešitev, vendar pa razlike, ki smo jih izmerili kažejo, da bi potrebovali niz standardov za različne velikosti PEGa in morda tudi za različna mesta vezave, kar dela ta pristop vprašljiv.

7 REFERENCE

1. Marinko P, Krbavčič A: Interferoni – klasifikacija, pridobivanje in delovanje, *Farmaceutski Vestnik* (2000); 51: 103-113
2. Vozelj M: Temelji imunologije, prva izdaja, DZS, d. d., Ljubljana, 2000: 239-258
3. Meager A: *The Molecular Biology of Cytokines*, prva izdaja, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, 1998: 1 -21, 116 – 124, 173 – 177, 181 - 215
4. Flint S. J, Enquist L. W, Racaniello V. R, Skalka A. M: *Principles of Virology, Molecular Biology, Pathogenesis and Control of Animal Viruses*, druga izdaja, American Society of Microbiology, Washington, 2004: 540 - 553
5. Meager A: Biological assays for interferons, *Journal of Immunological Methods* (2002); 261: 21-36
6. Štrukelj B, Kos J: *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*, prva izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007:399 - 412
7. Marinko P, Krbavčič A: Imunogenost inerferona: predklinično in klinično vrednotenje interferona α , *Farmaceutski Vestnik* (2001); 52: 163-171
8. Meager A, Gaines Das R, Zoon K, Mire-Sluis A: Establishment of new and replacement World Health Organization International Biological Standards for human interferon alpha and omega, *Journal of Immunological Methods* (2001); 257: 17-33
9. Marinko P, Krbavčič A: Molekulska in biološka karakterizacija rekombinantnega interferona α , *Farmaceutski Vestnik* (2000); 51: 115-120
10. Meager A, Gaines Das R: Biological standardization of human interferon beta: Establishment of a replacement world health organization international biological standards for human glycosylated interferon beta, *Journal of Immunological Methods* (2005); 306: 1-15
11. www.innovations-report.de/.../bericht-5038.html, 06.04.2007
12. Ealick S. E., Cook W. J, Vijay-Kumar S, Carson M, Nagabhushan T. L, Trotta P. P, Bugg C. E: Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma, *Science* (1991); 252: 698-702.
13. http://www.igb.fraunhofer.de/WWW/Presse/Jahr/1997/dt/PI_Interferon-Preis.dt.html, 06.04.2007
14. http://www.nature.com/nri/journal/v6/n11/fig_tab/nri1961_F2.html, 23.12.2007

15. <http://www.medicinenet.com/interferon/article.htm>, 29.03.2007
16. <http://www.hepatitis-c.de/ifne.htm>, 29.03.2007
17. <http://www.hepatos.hr/interferoni.htm>, 05.04.2007
18. Meager A: The Interferons: Characterization and Application, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim, 2006: 280-283; 339-366
19. Marinko P, Krbavčič A: Imunogenost inerferona: tehnično vrednotenje interferona α , Farmaceutski Vestnik (2001); 52: 153-161
20. <http://www.rsc.org/chemistryworld/News/2007/January/05010702.asp>, 23.12.2007
21. Foser S, Schacher A, Weyer K, Brugger D, Dietel E, Marti S, Schreitmüller T: Isolation, structural characterization, and antiviral activity of positional isomers of monopegylated interferon α 2a (PEGASYS), Protein Expression and Purification (2003); 30: 78-87
22. Dhalluin C, Ross A, Leuthold L, Foser S, Gsell B, Müller F, Senn H: Structural and Biophysical characterization of the 40 kDa PEG-Interferon- α 2a and Its Individual Positional Isomers, Bioconjugate Chemistry (2005); 16: 504-517
23. www.oeaz.at/.../19/serie/serie19_2002tara.html, 23.12.2007
24. Grace M, Youngster S, Gitlin G, Sydor W, Xie L, Westreich L, Jacobs S, Brassard D, Bausch J, Bordens R: Structural and Biologic Characterization of Pegylated Recombinant IFN- α 2b, Journal of interferon and cytokine research (2001); 21: 1103-1115
25. Youngster S, Wang Y, Grace M, Bausch J, Bordens R, Wyss D: Structure, Biology, and Therapeutic Implications of Pegylated Interferon Alpha-2b, Current Pharmaceutical Design (2002); 8: 2139-2157
26. Wang Y, Youngster S, Grace M, Bausch J, Bordens R, Wyss D: Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications, Advanced Drug Delivery Reviews (2002); 54: 547-570
27. Ramon J, Saez V, Baez R, Aldana R, Hardy E: PEGylated Interferon- α 2b: A Branched 40K Polyethylene Glycol Derivative, Pharmaceutical Research (2005); 22 (8): 1374-1386

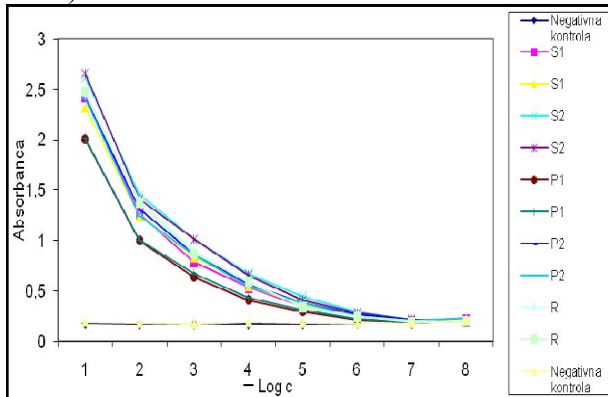
28. Grace M, Lee S, Bradshaw S, Chapman J, Spond J, Cox S, DeLorenzo M, Brassard D, Wylie D, Cannon-Carlson S, Cullen C, Indelicato S, Voloch M, Bordens R: Site of Pegylation and polyethylene Glycol Molecule Size Attenuate Interferon- α Antiviral and Antiproliferative Activities through the JAK/STAT Signaling Pathway, *The Journal of Biological Chemistry* (2005); 280 (8): 6327-6336
29. Meager A: Measurement of cytokines by bioassays: Theory and application, *Methods* (2006); 38: 237 - 252
30. Caserman S, Menart V, Gaines Das R, Williams S, Meager A: Thermal stability of the WHO international standard of interferon alpha 2b (IFN- α 2b): Application of new reporter gene assay for IFN- α 2b potency determinations, *Journal of Immunological Methods* (2007); 319: 6-12
31. Cooper G. M, Hausman R.E: *The Cell, A molecular approach*, četrta izdaja, ASM Press, Washington, 2007: 33 - 36
32. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, P. Scott M, Zipursky S. L, Darnell J: *Molecular Cell Biology*, peta izdaja, W. H. Freeman and Company, New York, 2003: 235 – 236
33. Freshney R. I: *Culture of Animal Cells: a manual of basic technique*, četrta izdaja, John Wiley & Sons, Inc, New York, 2000: 4 – 18, 89 – 101
34. Graham F. L, Smiley J, Russell W. C, Nairn R: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5, *The Journal of General Virology* (1977); 36:59 -74
35. Meager A, Visvalingam K, Dilger P, Bryan D, Wadhwa M: Biological activity of interleukins-28 in -29: Comparison with type I interferons, *Cytokine* (2005); 31: 109 -118
36. http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/info.php?dsmz_nr=305&from=cell_line_index&select=digit&term=&preselect=human;hamster;mouse;rat;insect;other&firstload=0, 11.03.2008
37. <http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=CRL-1573>, 11.03.2008

38. Däubener W, Wanagat N, Pilz K, Seghrouchni S, Fischer H G, Hadding U: A new, simple, bioassay for human IFN- γ , Journal of Immunological Methods (1994); 168: 39-47
39. <http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=CCL-185>, 30.11.2007
40. European Collection of Animal Cell Cultures, Catalogue of Cell Lines and Services, 4. Izdaja, PHLS Center for Applied Microbiology & Research, Porton Down, Salisbury, UK
41. <http://www.bioassay.de/>, 25.02.2008

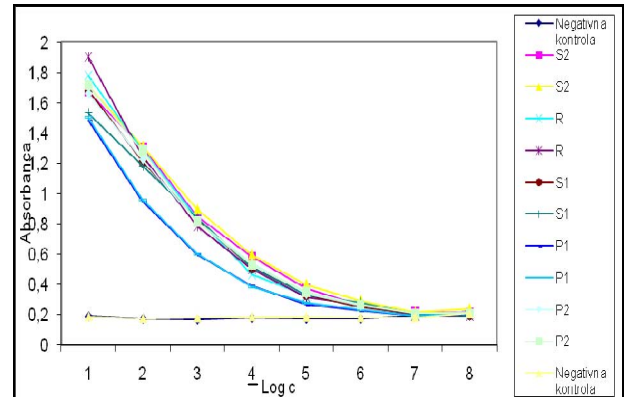
8 PRILOGA

Krivulje odvisnosti izmerjene absorbance v odvisnosti od logaritmov koncentracij vzorcev in standardov

a) Metoda RGA

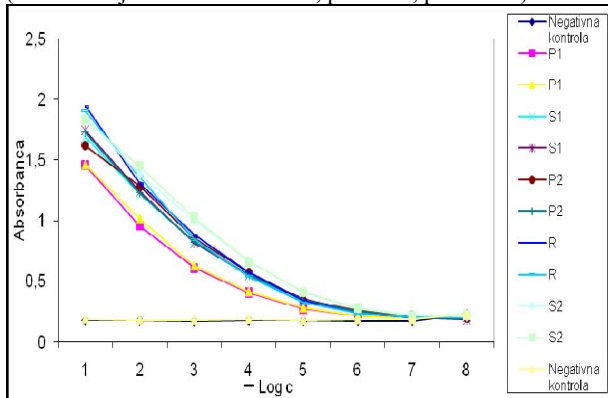


Slika 14: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij



Slika 16: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij

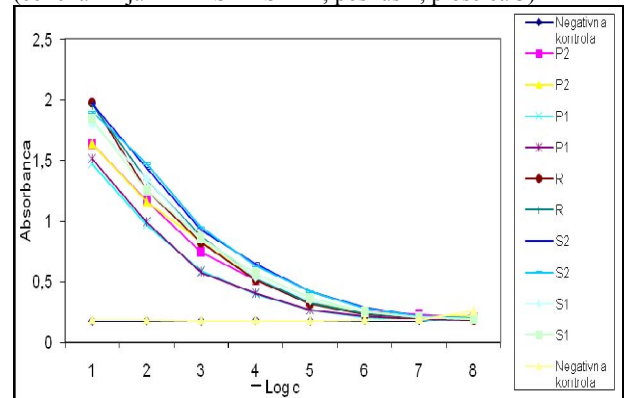
(celična linija HEK ISRE SEAP, poskus 1, ploščica 1)



Slika 15: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij

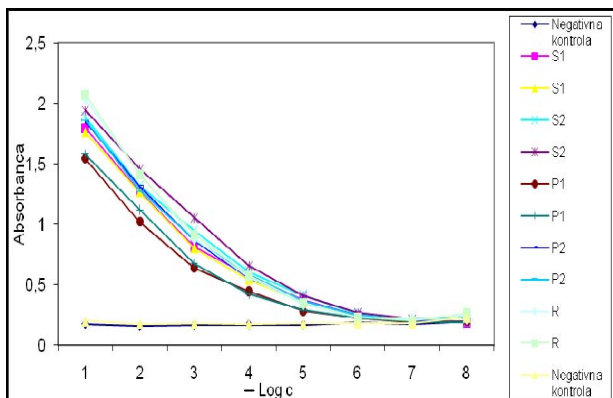
(celična linija HEK ISRE SEAP, poskus 1, ploščica 2)

(celična linija HEK ISRE SEAP, poskus 1, ploščica 3)

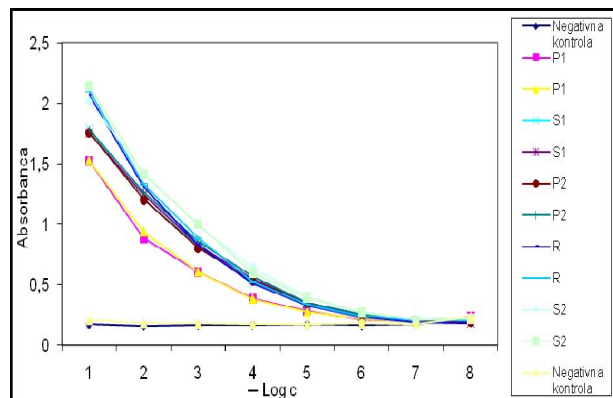


Slika 17: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij

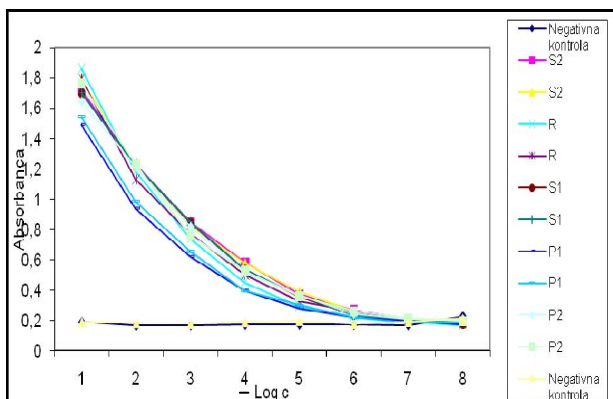
(celična linija HEK ISRE SEAP, poskus 1, ploščica 5)



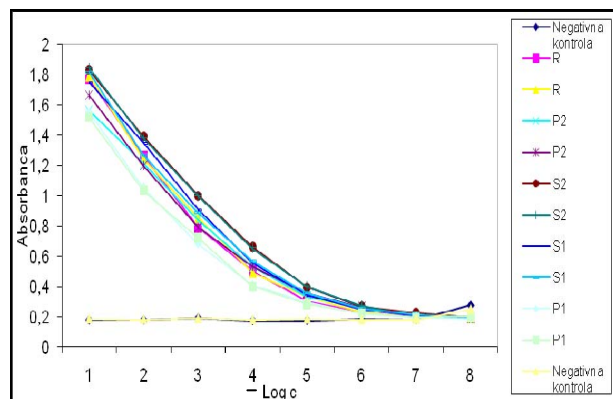
Slika 18: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija HEK ISRE SEAP, poskus 2, ploščica 1)



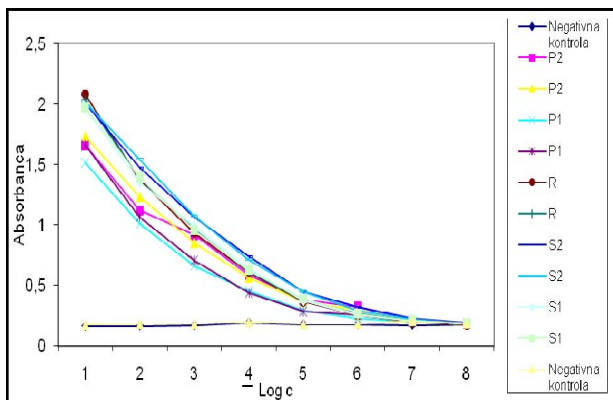
Slika 19: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija HEK ISRE SEAP, poskus 2, ploščica 2)



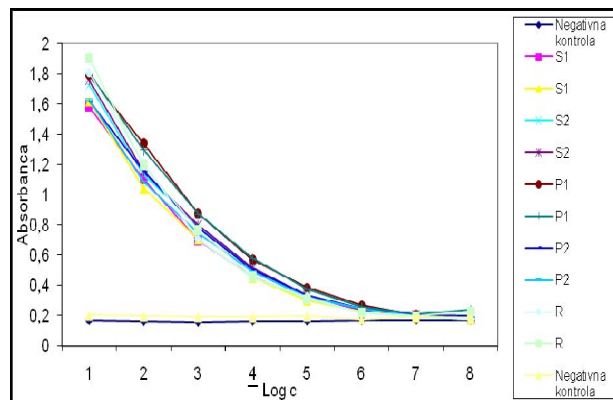
Slika 20: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija HEK ISRE SEAP, poskus 2, ploščica 3)



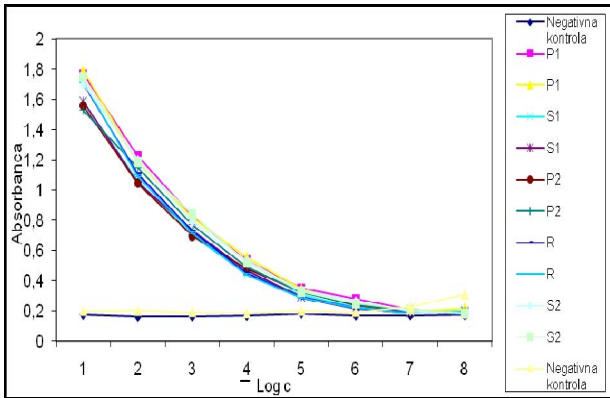
Slika 21: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija HEK ISRE SEAP, poskus 2, ploščica 4)



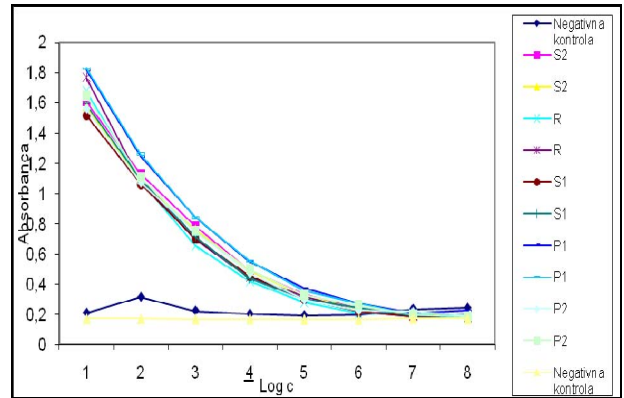
Slika 22: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija HEK ISRE SEAP, poskus 2, ploščica 5)



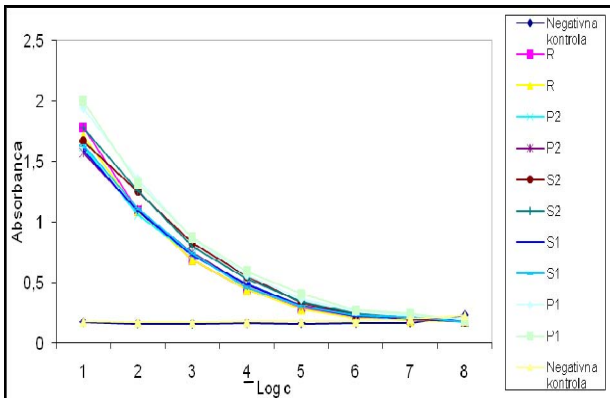
Slika 23: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija HEK ISRE SEAP, poskus 3, ploščica 1)



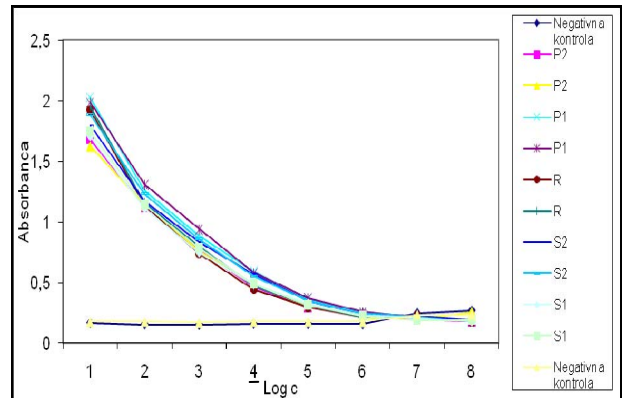
Slika 24: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija HEK ISRE SEAP, poskus 3, ploščica 2)



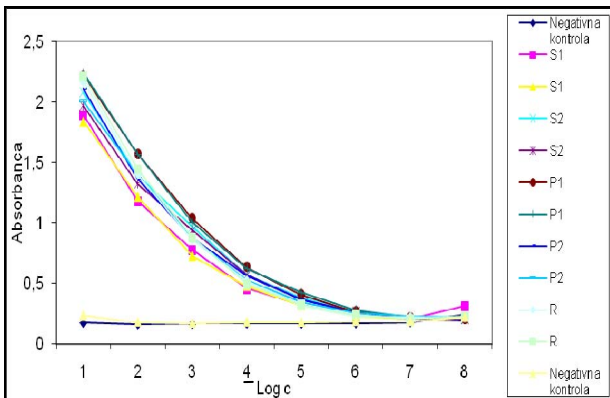
Slika 25: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija HEK ISRE SEAP, poskus 3, ploščica 3)



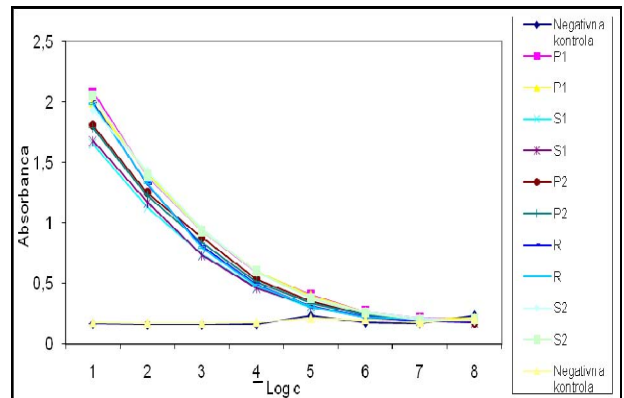
Slika 26: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija HEK ISRE SEAP, poskus 3, ploščica 4)



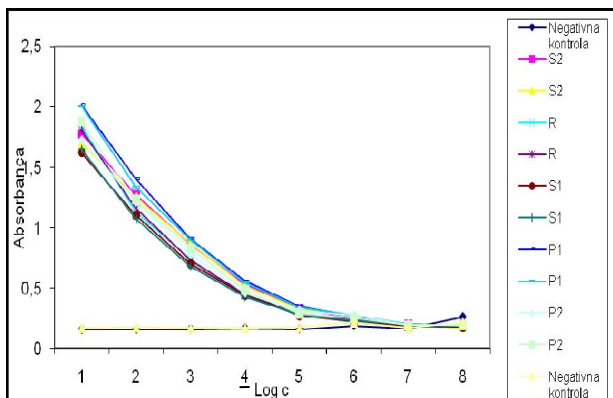
Slika 27: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija HEK ISRE SEAP, poskus 3, ploščica 5)



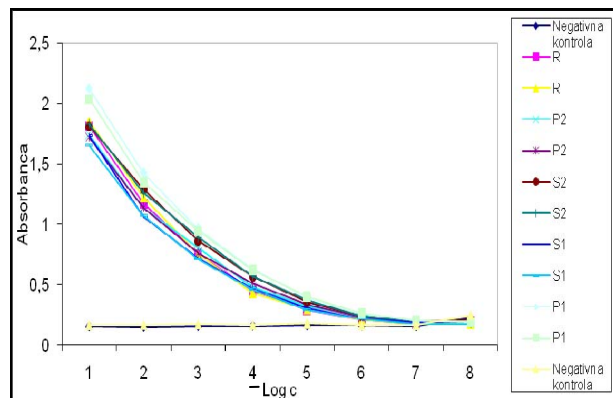
Slika 28: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija HEK ISRE SEAP, poskus 4, ploščica 1)



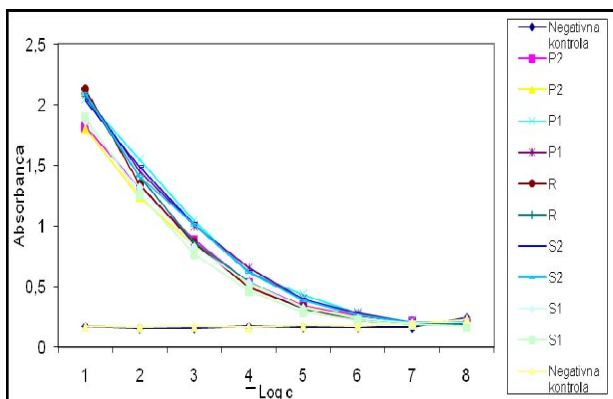
Slika 29: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija HEK ISRE SEAP, poskus 4, ploščica 2)



Slika 30: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija HEK ISRE SEAP, poskus 4, ploščica 3)

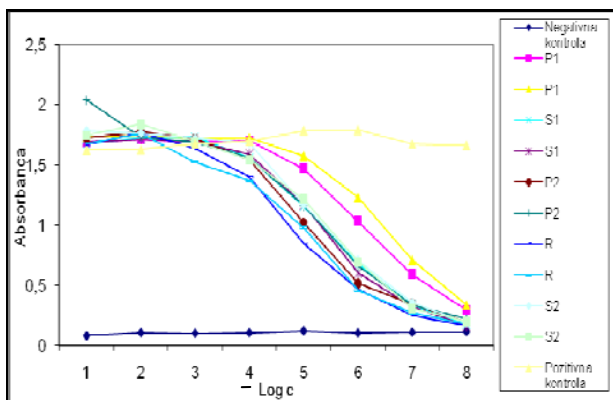


Slika 31: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija HEK ISRE SEAP, poskus 4, ploščica 4)

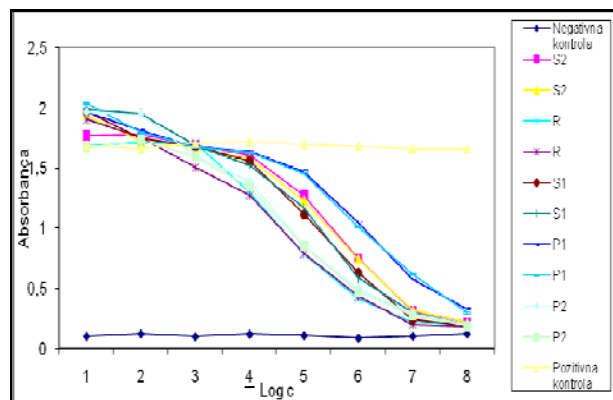


Slika 32: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija HEK ISRE SEAP, poskus 4, ploščica 5)

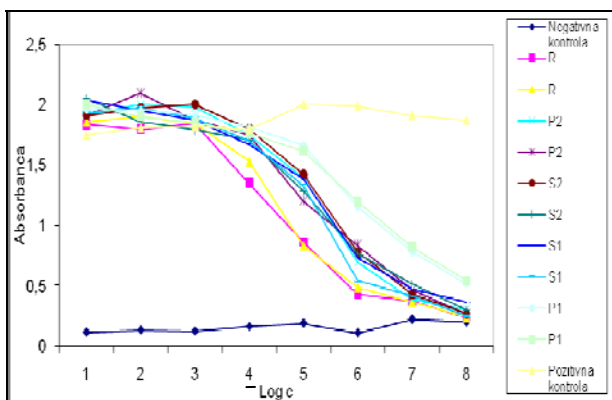
b) Metoda AVA



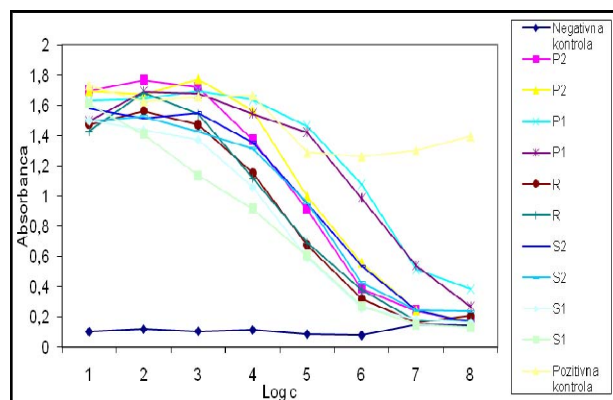
Slika 33: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija 2D9, poskus 1, ploščica 2)



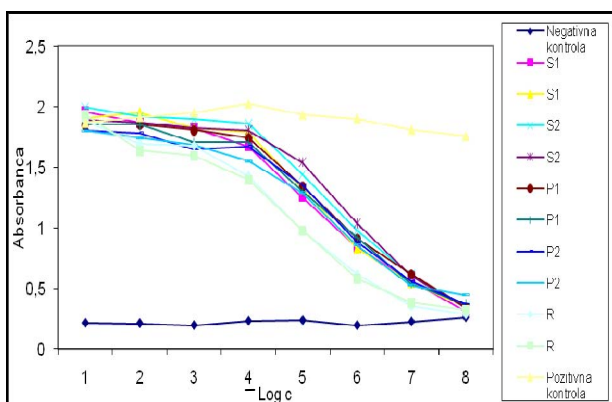
Slika 34: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija 2D9, poskus 1, ploščica 3)



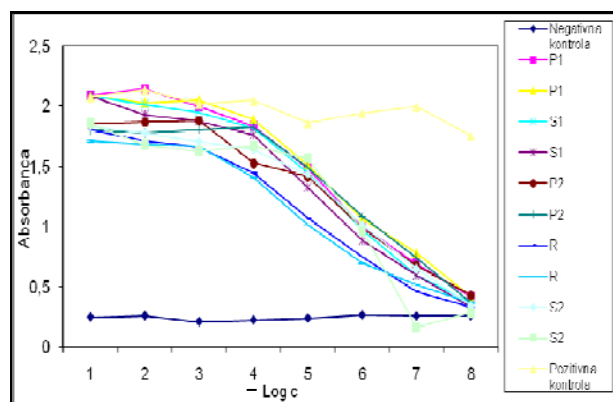
Slika 35: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija 2D9, poskus 1, ploščica 4)



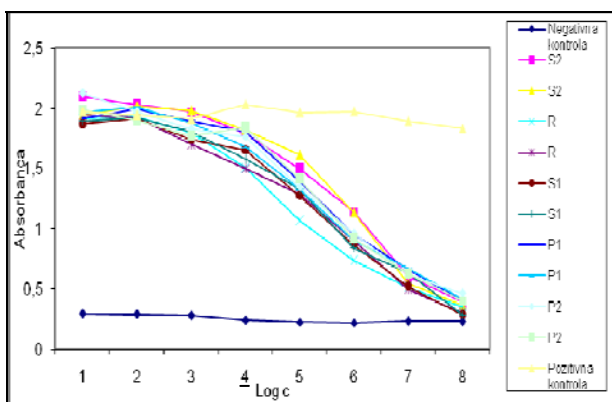
Slika 36: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija 2D9, poskus 1, ploščica 5)



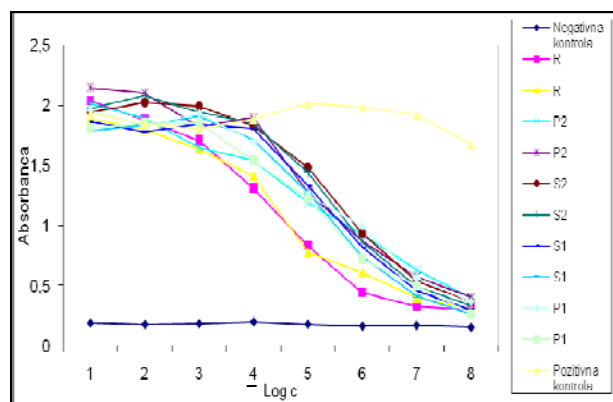
Slika 37: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija 2D9, poskus 2, ploščica 1)



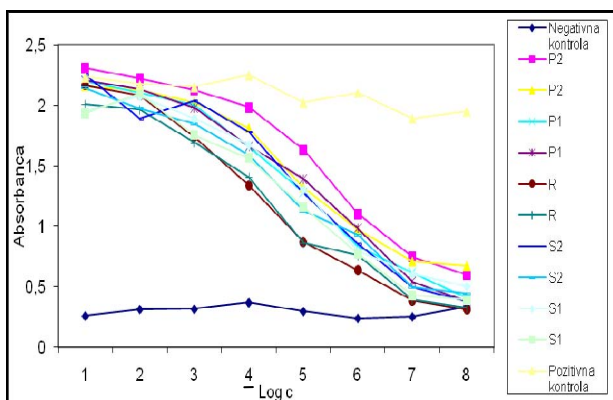
Slika 38: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija 2D9, poskus 2, ploščica 2)



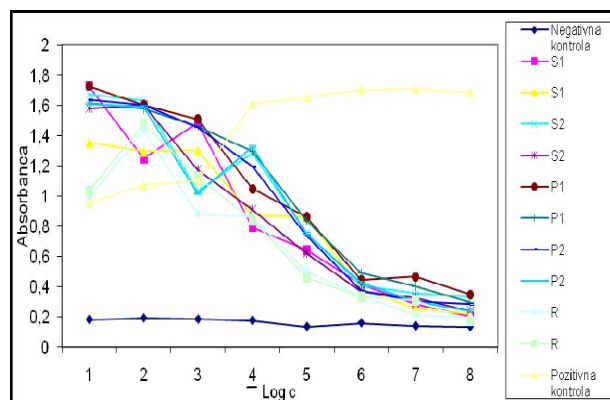
Slika 39: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija 2D9, poskus 2, ploščica 3)



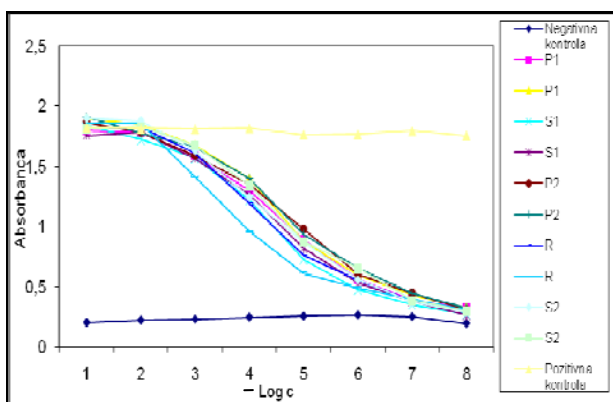
Slika 40: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija 2D9, poskus 2, ploščica 4)



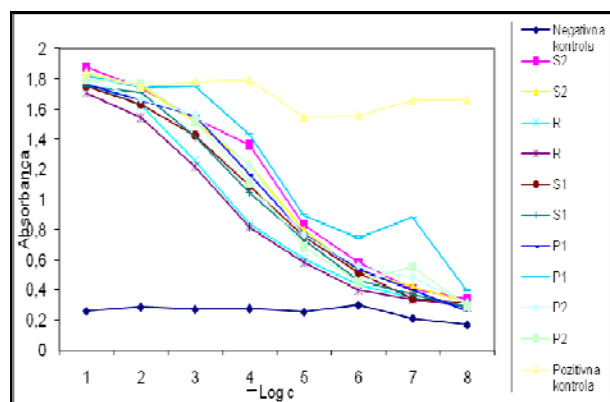
Slika 41: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija 2D9, poskus 2, ploščica 5)



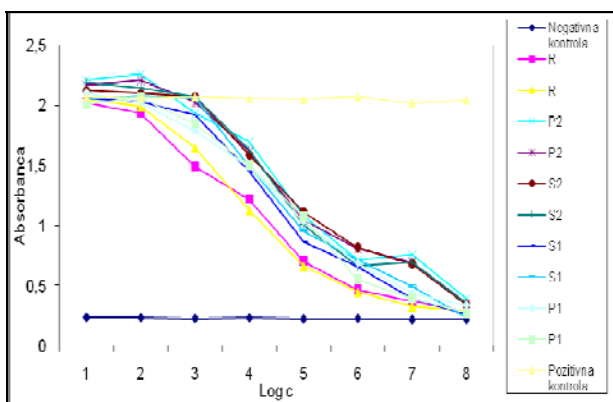
Slika 42: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija 2D9, poskus 3, ploščica 1)



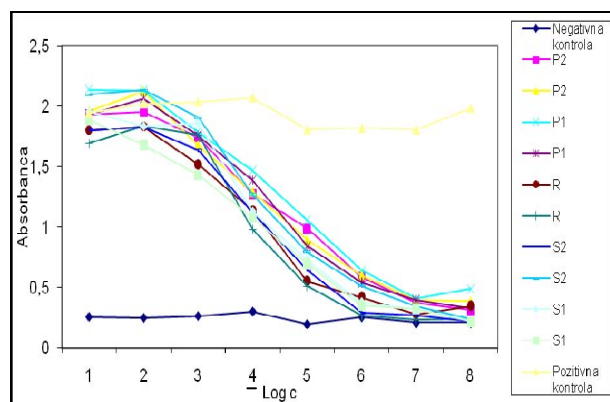
Slika 43: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija 2D9, poskus 3, ploščica 2)



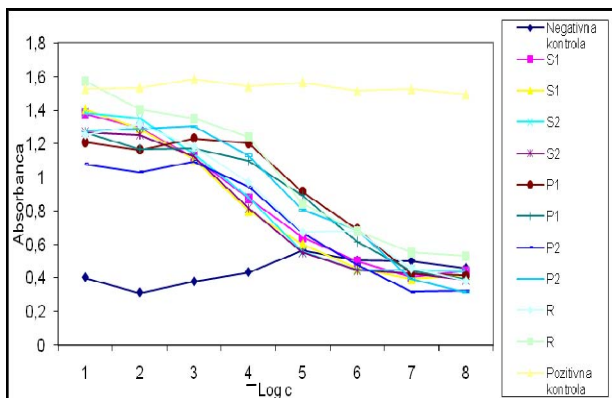
Slika 44: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija 2D9, poskus 3, ploščica 3)



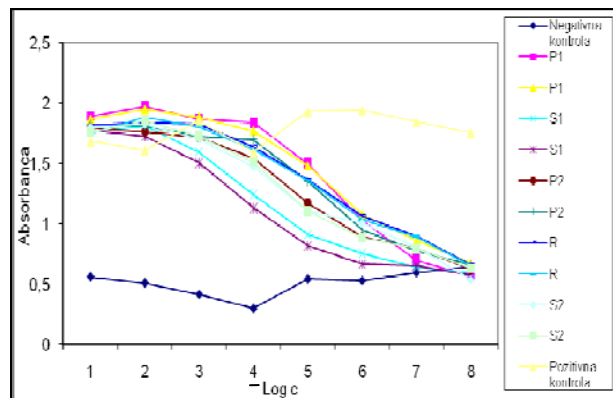
Slika 45: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija 2D9, poskus 3, ploščica 4)



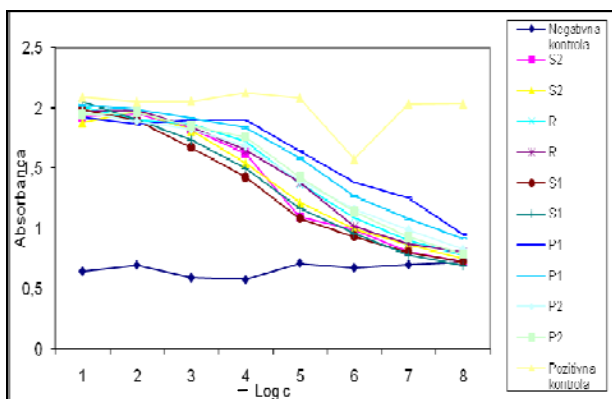
Slika 46: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija 2D9, poskus 3, ploščica 5)



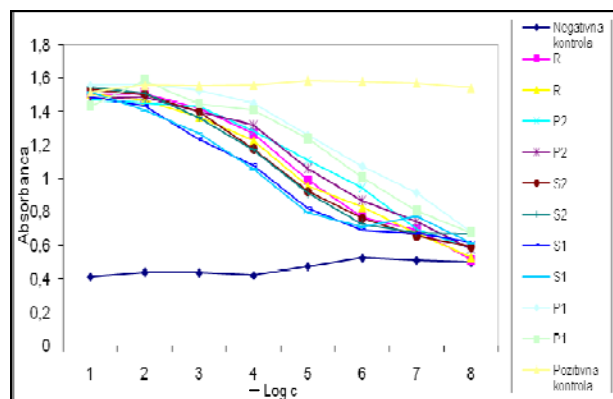
Slika 47: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija A549, poskus 1, ploščica 1)



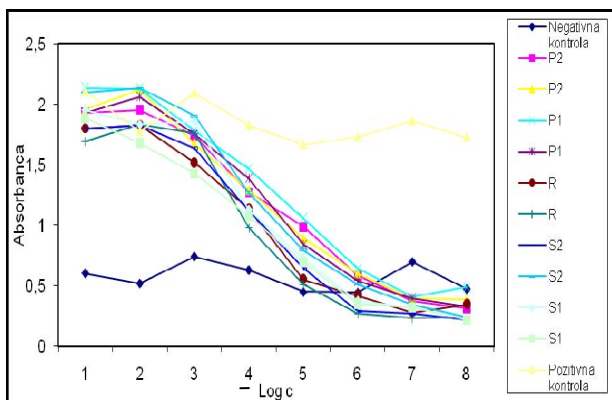
Slika 48: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija A549, poskus 1, ploščica 2)



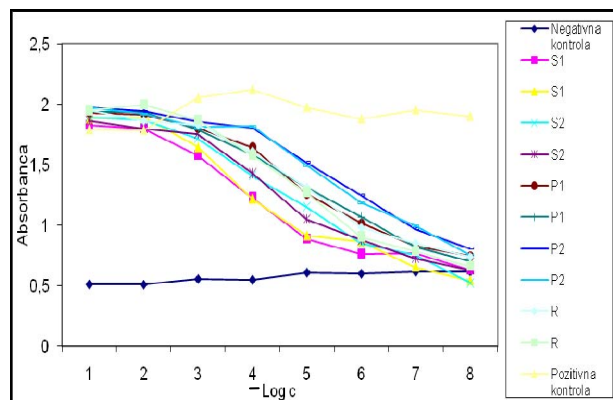
Slika 49: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija A549, poskus 1, ploščica 3)



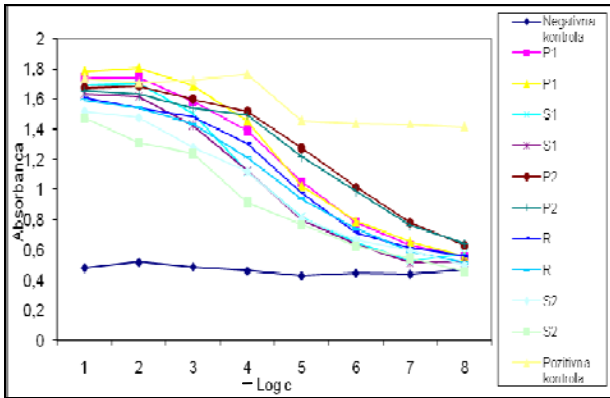
Slika 50: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija A549, poskus 1, ploščica 4)



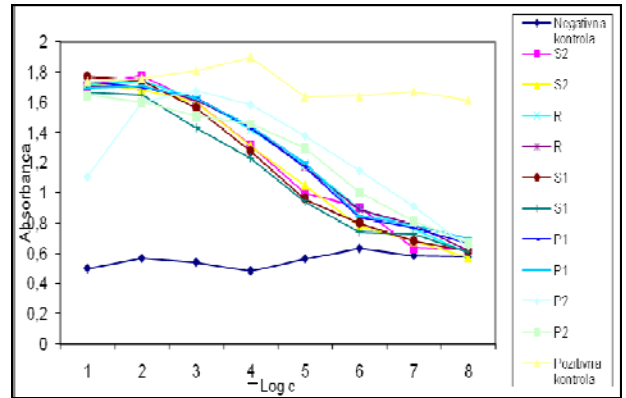
Slika 51: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija A549, poskus 1, ploščica 5)



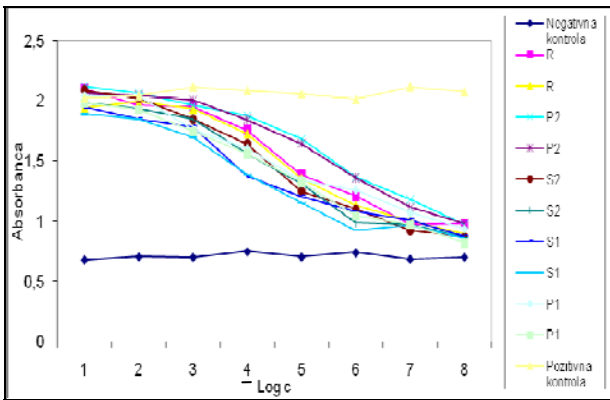
Slika 52: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija A549, poskus 2, ploščica 1)



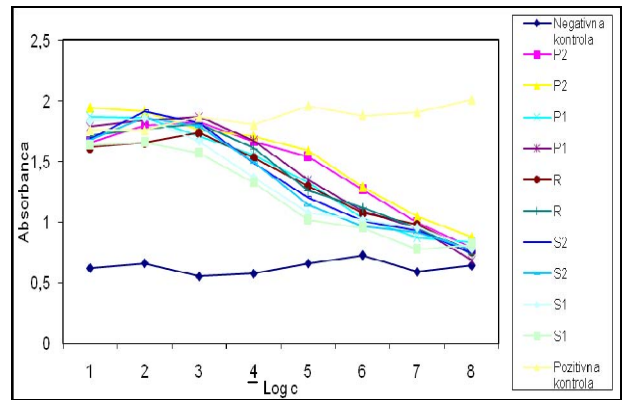
Slika 53: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija A549, poskus 2, ploščica 2)



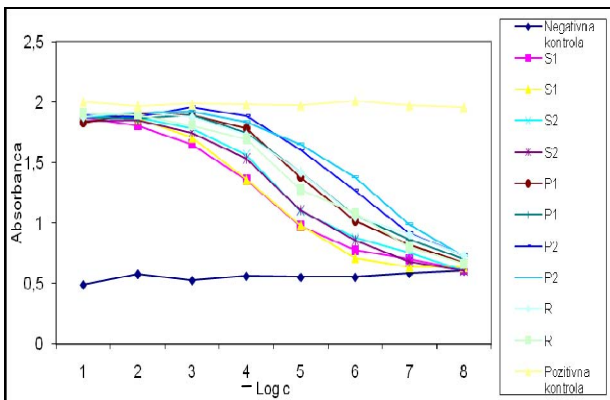
Slika 54: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija A549, poskus 2, ploščica 3)



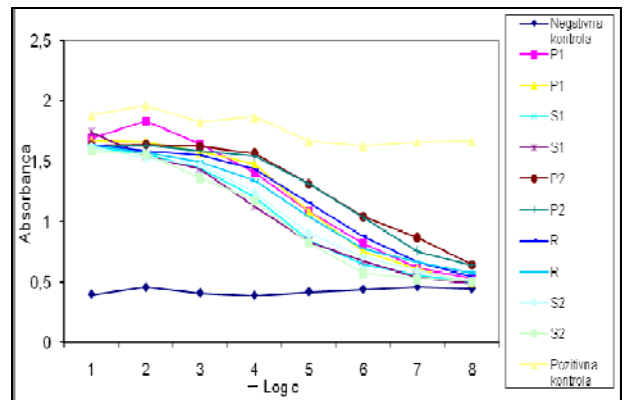
Slika 55: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija A549, poskus 2, ploščica 4)



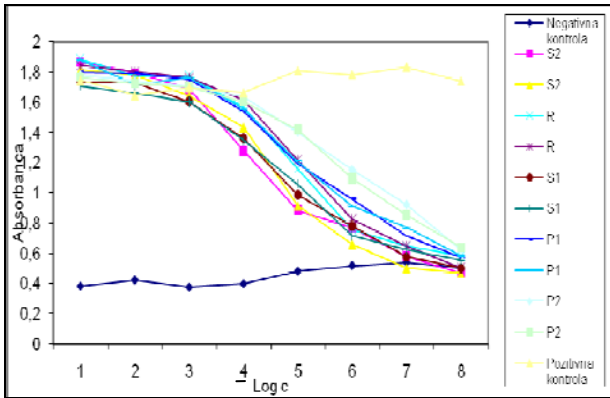
Slika 56: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija A549, poskus 2, ploščica 5)



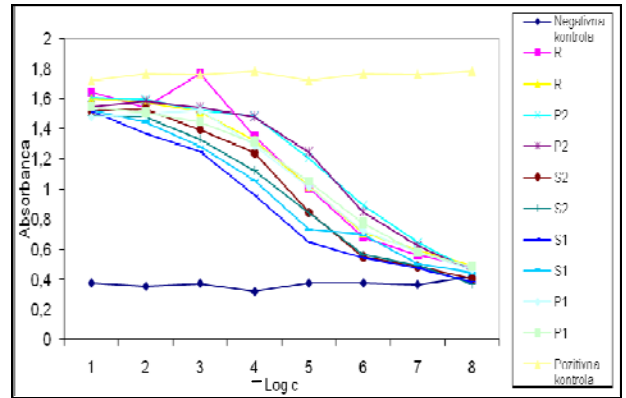
Slika 57: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija A549, poskus 3, ploščica 1)



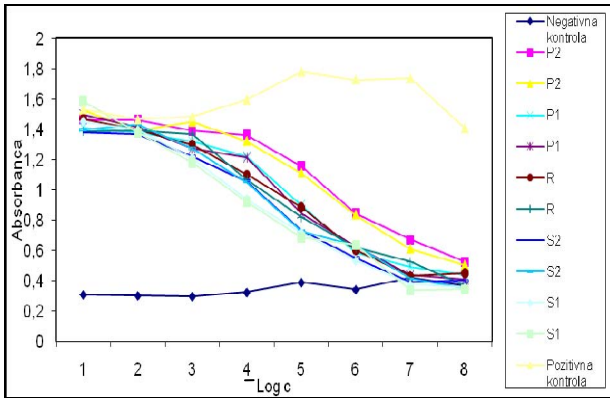
Slika 58: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija A549, poskus 3, ploščica 2)



Slika 59: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija A549, poskus 3, ploščica 3)



Slika 60: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija A549, poskus 3, ploščica 4)



Slika 61: Odvisnost absorbance od logaritma koncentracij (celična linija A549, poskus 3, ploščica 5)