



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ



Братислав П. Станковић

**ПРЕДНОСТИ УПОТРЕБЕ БИОТЕХНОЛОШКОГ
ПОСТУПКА ПРОДУКЦИЈЕ ИНТЕРФЕРОНА-ГАМА
ИЗ ПРЕЧИШЋЕНЕ СУСПЕНЗИЈЕ ХУМАНИХ ЛЕУКОЦИТА**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор
Проф. др Борислав Каменов

Ниш, 2015.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Bratislav P. Stanković

**THE ADVANTAGE OF USING BIOTECHNOLOGICAL
TREATMENT OF INTERFERON-GAMMA
FROM A REFINED SUSPENSION OF HUMAN LEUKOCYTES**

DOCTORAL DISSERTATION

Mentor
Prof. Borislav Kamenov, Ph.D.

Niš, 2015.

I Аутор	
Име и презиме:	Братислав Станковић
Датум и место рођења:	03. 01. 1959. Ниш
Садашње запослење:	Висока здравствена школа струковних студија у Београду, Цара Душана 254, Земун, Србија
II Докторска дисертација	
Наслов	Предности употребе биотехнолошког поступка продукције интерферона-гама из пречишћене суспензије хуманих леукоцита
Број страница:	124
Број шема / слика:	7/ 15
Број табела:	11
Број графикона:	5
Број библиографских података:	125
Установа и место где је рад израђен	Институт за трансфузиологију ВМА; Институт за медицинску биохемију ВМА; Институт за Вирусологију и имунологију "Торлак" Београд
Научна област:	Имунологија и трансфузиологија
Ментор:	Проф. др Борислав Каменов
III Ocena i odbrana	
Датум пријаве теме:	09. 02. 2015.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:	06-Д-854/14; од 27. 05. 2015. године.
Комисија за оцену подобности теме и кандидата:	1. Проф. др Горан Марјановић (председник); 2. Проф. др Борислав Каменов (ментор, члан) 3. Проф. др Гордана Коцић (члан) 4. Проф. др Добрила Станковић-Ђорђевић (члан) 5. Проф. др Марија Ромић (члан).
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:	1. Проф. др Горан Марјановић (председник); 2. Проф. др Борислав Каменов (ментор, члан) 3. Проф. др Гордана Коцић (члан) 4. Проф. др Добрила Станковић-Ђорђевић (члан) 5. Проф. др Марија Ромић (члан).
Датум одбране докторске дисертације:	

Bratislav Stankovic, Maja Surbatovic, Goran Stojanovic, Milutin Mihajlovic, Zoran Tambur, Zoran Kulisic, Miroslav Markovic. Treatment for production of interferon-alpha (ifn- α) and interferon - gamma (ifn- γ) from the same purified suspension of leukocytes. Scientific Research and Essays 2011; 6(7): 1522-1529.

ЗАХВАЛНИЦА

- Мом ментору проф. др *Бориславу Каменову* захваљујем што ми је помогао, не само у истраживачком раду при изради моје докторске дисертације, већ ми је пружио и корисне савете и неизмерну подршку да истрајем до краја.
- Посебно се захваљујем и члановима комисије: проф. др Горану Марјановић; Проф. др Гордани Коцић; Проф. др Добрили Станковић-Ђорђевић; проф. др Марији Ромић на пруженим сугестијама које су ми омогућиле да успешно довршим моју докторску дисертацију.
- Драгоцену помоћ и корисне савете пружио ми је проф. др *Богдан Бошковић* у истраживању теме, а посебно при завршном обликовању докторске дисертације.
- Велику захвалност дугујем проф др сц. мед. *Радојки Бокун* за пружену стручну помоћ у тумачењу лабораторијских резултата испитиваних хемопродуката.
- Дугујем неизмерну захвалност свим колегама Високе здравствене школе струковних студија у Београду, а посебно директорки школе проф. др сц мед. *Анђелки Лазаревић*, на пруженој помоћи и подршци да успешно урадим моју докторску дисертацију.
- Захвалан сам вишем мед. техничару *Свети Стојановићу* и осталим драгим сарадницима у "Одсеку за производњу интерферона Института за имунологију и вирусологију Торлак", који су ми пружили подршку и помоћ у непосредном извођењу истраживања.
- Неизмерну захвалност дугујем за несебично пружену помоћ својим пријатељима, проф. др *Зорану Кулишићу* са Ветеринарског факултета и проф. др *Зорану Тамбуру* са Института за хигијену ВМА, у објављивању стручног рада са тематком везаном за докторску дисертацију, у престижном медицинском часопису **Scientific Research and Essays**, што је био услова за јавну одбрану докторске дисертације.

- Драгом пријатељу дипл. инг. електронике **Милету Ж. Ранђеловићу** захваљујем на помоћи и ангажовању у компјутерској обради текста, табела, шема, графикана, статистичких података и видео-бим презентацији као и естетском дотеривању моје докторску дисертацију.
- **Професору српског језика Надежди Милошевић** захваљујем за време које је одвојила за лекторски рад на мојој дисертацији.
- Неизмерну захвалност дугујем драгом пријатељу **др Драгиши Стефановићу** без чије несебичне помоћи и логистичке подршке не би остварио крајњи циљ.
- Велику подршку, поверење и бодрење да истрајем до краја у изради моје докторске дисертације пружиле су ми **супруга Марина** и **кћи Милица** и својим разумевањем олакшали су ми да се потпуно посветим истраживачком и експерименталном раду на изради моје докторске дисертације.
- Моралну подршку у изради докторске дисертације пружила ми је **мајка Јаворка, сестра Зорица, сестрић Михајло**, рођаци и многобројни пријатељи верујући у моју упорност и истрајност у раду.



**Ћерки *Милици*,
која је смисао и
крајњи циљ у мом животу**

ПРЕДНОСТИ УПОТРЕБЕ БИОТЕХНОЛОШКОГ ПОСТУПКА ПРОДУКЦИЈЕ ИНТЕРФЕРОНА-ГАМА ИЗ ПРЕЧИШЋЕНЕ СУСПЕНЗИЈЕ ХУМАНИХ ЛЕУКОЦИТА

Кратак садржај

Интерферони (IFN) су први пут описани крајем педесетих година двадестог века као посебни протеини у фамилији цитокина и индуковани су у домаћину, након инвазије вируса. Уколико су пренети у свежа ткива, запажена је антивирусна активност, захваљујући инхибицији процеса репликације вируса. У имунологији је ова појава позната као "интерференција". У нормалним условима у људском организму концентрација IFN-а је испод детектабилног нивоа јер ћелије нити синтетишу нити садрже IFN као свој конститутивни елемент. Извршена је подела IFN-а у три класе: IFN- α , IFN- β и IFN- γ . Већина ћелија сисара стварају у неједнаким количинама IFN- α и IFN- β после стимулације вирусима или другим агенсима, односно индукторима синтезе IFN-а.

У многим земљама и даље је задржан биотехнолошки поступак производње хуманих IFN-а (hIFN-а) за клиничку примену из хуманих леукоцита, издвојених из јединице конзервисане целе крви, не старије од 6 сати. После центрифуговања, поступком делеукоцитирања, издваја се buffy coat (суспензија леукоцита) као "нус"-продукат. Даљом обрадом "buffy coat" (БЦ) се пречишћава од еритроцитне контаминације, у циљу добијања што чистије подлоге хуманих леукоцита, која се излаже вирусној инфекцији ради стимулације синтезе hIFN- γ . Различити вируси се употребљавају као индуктори синтезе hIFN- γ , али се у пракси најчешће користи "Sendai" вирус, култивисан на хорион-алантоичној мембрани пилећег ембриона. Индукција синтезе hIFN- γ одиграва се на температури од +37 °C и траје 18 сати. Пречишћена суспензија хуманих леукоцита може бити третирана "лиофилизованом фитохемаглулинином" - ПХА-П који се користи као индуктор синтезе hIFN- γ .

Реализација ове докторске дисертације има двоструки значај: фундаментални и практични. У фундаменталном погледу добио се временски ток података о морфологији, вијабилности и индукционе способности леукоцита, односно њихова способност да под утицајем индуктора синтезе hIFN- γ (вируса или лиофилизованог хемаглутина) дају већи принос интерферона, у новим предложеним

условима. У практичном погледу треба објединити да, када би се користиле укупне количине БЦ-а из свих трансфузиолошких центара у Републици Србији као сировина за производњу hIFN- γ , тиме би се произвеле довољне количина hIFN- γ , као биотерапеутског производа, како би се покриле не само потребе РСрбије, већ би се обезбедио и извоз одређених количина ових препарата у земље са недовољним финансијским средствима.

Закључак:

1. Већи принос и појачана антивирусна активност hIFN- γ у препаратима припремљеним из суспензије леукоцита добијених из пулова "buffy coat"-а којима су додати раствори 10% декстрана и 6% хидрокси етилног скроба високе молекулске масе у односу на суспензије леукоцита припремљених на уобичајени (досадашњи) начин.
2. Бољи и ефикаснији биотехнолошки поступак продукције поступак продукције hIFN- γ , у односу на досадашњи поступак добијања hIFN- γ по модификованом "Cantell"-овом методу.
3. Хумани леукоцити који се користе за продукцију hIFN- γ вијабилнији и имају већу индукциону способност, док иста суспензија леукоцита која се користи за продукцију hIFN- γ по модификованом "Cantell"-овом методу има слабији капацитет вијабилности и индукциону способности хуманих леукоцита.
4. Лиофилизовани фитохемаглутинин - ПХА-П, коришћен као индуктор синтезе за hIFN- γ , иако слабији индуктор од "Sendai" вируса, добар је индуктор синтезе који је успешно индуковао хумане леукоците у пречишћеној суспензији.

Кључне речи: хумани интерферон гама (hIFN- γ); суспензија леукоцита; "buffy coat" (БЦ); индуктори синтезе интерферона.

Научна област: Трансфузиологија

Ужа научна област: Имунологија

УДК:

THE ADVANTAGE OF USING BIOTECHNOLOGICAL TREATMENT OF INTERFERON-GAMMA FROM A REFINED SUSPENSION OF HUMAN LEUKOCYTES

Summary

Interferons (IFN) are first described in the late fifties of the twentieth century as special proteins in the family of cytokines and induced by the host, after invasion virus. If you are transferred to the fresh tissue was observed antiviral activity, thanks to inhibit replication of the virus. In this appearance immunology known as "interference". Under normal conditions in the human body concentration of IFN- α was below detectable levels or because cells synthesize IFN or contain as its constituent element. IFN was divided in three classes: IFN- α , IFN- β and IFN- γ . Most mammalian cells formed in unequal quantities of IFN- α and IFN- β after stimulation with viruses or other agents, or inducers of the synthesis of IFN.

In many countries, is still detained biotechnological process for the production of human IFN (hIFN) for the clinical application of human leukocytes allocated from canned whole blood units, not older than 6 hours. After centrifugation the procedure centrifugation devotes a buffy coat (leukocyte suspension) as a "side" -produkt. Further processing of "buffy coat" (BC) was purified from the red cell contamination, in order to obtain as pure substrate of human leukocytes, which is subjected to viral infection in order to stimulate the synthesis of hIFN- γ . Different viruses are used as inductors synthesis hIFN- γ , but in practice most often used "Sendai" virus, cultivated in horion-alantoic membrane of chicken embryos. Induction of synthesis hIFN- γ played on temperature of +37 ° C and lasts 18 hours. Refined suspension of human tal and practical. In fundamental respects got the time sequence data on the morphology, viability and induction capabilities of leucocytes, or their ability under the influence of the inductor synthesis hIFN- γ (or lyophilized virus hemagglutinin) higher yields of interferon, in the new proposed terms. In practical terms should consolidate that, when using a total amount of BC and from all transfusion centers in the Republic of Serbia as a raw material for the production of IFN- γ , in order to produce sufficient quantities IFN- γ , as biotherapeutic products, to cover not only needs Republic of Serbia, but to ensure the export of certain quantities of these products in countries with insufficient financial resources.

Conclusions:

1. Learn yield and enhanced the antiviral activity of hIFN- γ in the compositions prepared from the suspension of leukocytes obtained from the pools "buffy coat"s which are added to dissolve dextran and 10% 6% hydroxy ethyl starch high molecular weight compared to the leukocyte suspension prepared in the conventional (current) method.
2. Better and more efficient biotechnological production process hIFN- γ , compared to the current procedure of obtaining hIFN- γ according to the modified "Cantell's" method.
3. The human leukocytes used for the production of hIFN- γ move more and have a greater ability to induction, while the same suspension of leukocytes is used for the production of hIFN- γ according to the modified "Cantell's" method has a stronger capacity of cell viability and induction ability of human leukocytes.
4. The lyophilized phytohemagglutinin - PHA-P, used as an inductor for the synthesis of hIFN- γ , although weaker than inductor "Sendai" virus, is a good inducer of the synthesis of which has been successfully induced human leukocytes in purified suspension.

Keywords: human interferon gamma (hIFN- γ); suspension of leukocytes; "Buffy coat" (BC); interferon inducers of the synthesis.

Keywords: human interferon gamma (hIFN- γ); suspension of leukocytes;
"Buffy coat" (BC); interferon inducers of the synthesis

The scientific field: Transfusiology

Special topics: Immunology

UDC:

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
2. ДОСАДАШЊА САЗНАЊА.....	5
2.1. Дефиниција и основне биолошке карактеристике цитокина	5
2.2. Историјат открића и развоја сазнања о интерферонима.....	11
2.3. Типови IFN-a и њихова индукција.....	19
2.4. Молекулски механизми дејства интерферона	30
2.5. Клонирање IFN-ских гена у експресионим векторима	35
2.6. Дефиниција активности IFN-a.....	39
2.7. Биолошки ефекти IFN-a	39
2.8. Антивирусна активност IFN-a	41
2.9. Антипролиферативни ефекат	49
2.10. Имуномодулаторни ефекат IFN-a	50
2.11. Антитуморско дејство IFN-a.....	55
2.12. IFN-и као цитокини и лимфокини.....	58
2.13. Улога IFN-a у болестима.....	59
2.14. Перспективе за клиничку употребу IFN-a.....	60
2.15. Извори за производњу хуманих интерферона за клиничку примену.....	62
3. ХИПОТЕЗА	64
4. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	65
5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	67
6. ЗНАЧАЈ ИСТРАЖИВАЊА	74
7. РЕЗУЛТАТИ.....	76
8. ДИСКУСИЈА.....	94
9. ЗАКЉУЧЦИ	112
10. ЛИТЕРАТУРА.....	115

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

0,1 N NaOH	= 0,1-но нормални раствор натријум хидроксида;
0,83% NH₄Cl	= 0,83-тро процентни раствор амонијум хлорида;
1N HCl	= једно нормални раствор хлороводоничне киселине;
2'5' - OA-sistem	= 2'5' - олиго аденилат систем;
5 M KSCN	= пето моларни раствор калијум тиоцијаната;
67-kd ПК систем	= систем протеин киназе молекулске масе од 67 kilo Daltona;
АЦС	= "The American Cancer Society (ACS) " - "Америчка асоцијација за борбу против рака" ;
АДЦЦ	= ћелијске цитотоксичности зависне од антитела - "antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity";
АТП	= аденозин-три-фосфат;
БЦ	= buffy coat - суспензије леукоцита;
БЦ-I	= дилуирани buffy coat;
БЦ-II	= buffy coat сиромашан у тромбоцитима ("суви" БЦ);
БСФ-2	= стимулишућим фактором за Б-лимфоците;
°C	= "Целзијусов" степен
цАМФ	= циклични-аденозин-моно-фосфат;
цГМФ	= циклични-гуанин-моно-фосфат;
ЦМИ	= инхибиторна активност ћелијске мултиплкације;
ЦМЛ	= хронична мијелоцитна леукемија;
ЦПД	= цитрат-фосфат-декстроза (антикоагуланс-конзерванс);
ЦПЕ	= цитопатогени ефекат;
ЦСФ-1	= фактор раста хематопоезних ћелија;
dsRNK	= дволанчана рибонуклеинска киселина;
ELLISSA	= тестови за откривање маркера изазивача крвљу преносивих болести;
Ер	= еритроцити;
ЕСБЦ-I	= експериментална серија "buffy coat"-а где је додаван 10% раствор декстрана;
ЕСБЦ-II	= експериментална серија "buffy coa"-а где је додаван 6% раствор хидрокси етилног скроба;
Фц-фрагмент	= "фрагмент имуноглобулина који може кристалисати";
G-CSF	= фактор раста гранулоцитопоезе;
GM-CSF	= фактор раста грануло-моноцитопоезе;
ХЕС	= хидроксиетилни скроб;

ХЦЈ	=	леукемија власстих ћелија;
ХИВ	=	вирус хумане имунодефицијенције;
НЛА	=	систем леукоцитних антигена;
ХПГФ	=	фактор раста плазмоцитома;
ХСФ	=	хепатоцито-стимулишућим фактор;
Ht	=	хематокрит;
IFN	=	интерферон;
hIFN	=	хумани интерферон;
rIFN-a	=	рекомбинантни интерферон;
IFN-α	=	интерферон-алфа;
IFN-β	=	интерферон-бета;
IFN-γ	=	интерферон-гама;
IL-2	=	интерлеукин-два ;
IU	=	интернационална јединица;
ЈЦК	=	јединица целе крви;
КСБЦ	=	контролна серија "buffy coat"-а припремана на досадашњи начин;
ЛФА-1 и Мац-1	=	гликопротеини који посредују у адхезији између лимфоцита, моноцита и гранулоцита;
ЛГЛ-ћелије	=	"large granular lymphocytes" - велики гранулирани лимфоцити;
LRNK-аза	=	лабилна рибо нуклеаза;
МАФ	=	фактор који активира макрофаге;
М-ЦСФ	=	фактор раста моноцитопоезе;
MEM	=	минимални есенцијални медијум;
Mg²⁺	=	двовалентни магнезијумов јон
МНС	=	"главни комплекс хистокомпатибилности";
МИФ	=	"фактор који спречава миграцију моноцита"
mRNK	=	месенџер рибо нуклеинска киселина;
ng	=	нанограм (10^{-6} г) – милионити део грама;
NAT PCR	=	"Nucleid Acid Testing - PCR" (савремена технологија ланчаних реакција и вишеструког умножавања вирусних партикула);
NK ћелије	=	ћелије природне убице;
p	=	процене степена вероватноће;
PBS	=	фосфатни пуфер;

pg	=	пикограм (10^{-9} г) – милијардити део грама;
Phil+	=	присутан "Филаделфија" хромозом;
ПИФ	=	пречишћени IFN;
rDNK	=	рекомбинантни ДНК;
δ (X)	=	стандардна девијација или стандардно одступање;
СДС	=	натријум додецил сулфат;
$\bar{x}$	=	средња вредност (аритметичка средина);
t-тест	=	Student-ов t тест (користи се за тестирање разлика аритметичких средина испитиваних величина);
TNF	=	фактор некрозе тумора;
ТПА	=	тетрадеканол-форбол-ацетат;
SZO	=	Светска здравствена организација
WISH	=	континуирана хомологна култура ткива хуманог амниона.

1. УВОД

Почетком двадесетог века откривено је постојање цитокина. Тада је потврђено да у организму постоје неке супстанце које су посредници ћелијских интеракција. Установљено је да ове супстанце представљају главну комуникациону мрежу која преноси различите сигнале које су од важности за широк дијапазон ћелијских функција. Ове супстанце су данас означене као модифери. У групу модифера разврстани су и цитокини који данас представљају "хит" у модерној медицинској науци (1-7). **Цитокини** су по хемијском саставу гликопротеини растворљиви у ћелијском медијуму који делују као модифери (медијатори и/или модулатори хемобиолошких одговора). Њиховим посредовањем остварују се бројне локалне и системске реакције природног и стеченог имунитета, као што су хематопоеза, имуни, инфламаторни и други процеси у организму (1-4, 8, 9). Анализом литературних података (2, 3, 9-13), дошло се до сазнања да су познате различите класификације цитокина. Најприхватљивија њихова подела је у шест посебних категорија: 1) фактори раста хематопоезе; 2) интерлеукини; 3) интерферони (IFN-и); 4) фактори некрозе тумора; 5) фактори трансформације раста и 6) остали фактори раста.

Крајем прве половине двадесетог века први пут су описани IFN-и као посебни протеински молекули, који ако су индуковани у домаћину након инвазије вируса, том приликом показују антивирусну активност. На почетку ових истраживања, **Isaacs и Lindenmann** (1957), размножавали су инактивирани вирус инфлуенце (топлотом) на хорион-алантоичној мембрани пилећег ембриона. Када су пренели тај медијум у свежа ткива у којима се већ налазио вирус инфлуенце, дошло је до појаве инхибиције процеса репликације вируса. Сматрали су да се у третираном ткиву збива имунолошки феномен позната као "интерференција" (када се у ћелији налази један вирус он не дозвољава размножавање другог вируса у истој ћелији) (1, 3, 10, 11, 13, 14). После тих почетних открића Isaacs и Lindenmann су дефинисали **"интерферон као солубилни фактор пилеће хорион-алантоичне мембране која је била изложена инактивном вирусу инфлуенце"**. **Tyrrrel (1959)** је установио концепт **"специес специфичности"**, тј. IFN је специфичан за врсту, односно, IFN добијен из ћелија хорион-алантоичне мембране пилећег ембриона не испољава антивирусно дејство на ћелије говечета и обрнуто (5, 6, 12, 13, 21).

У нормалним условима у људском организму концентрација IFN-а је испод детектабилног нивоа јер ћелије нити синтетишу нити садрже IFN као свој конститутивни елемент (3, 5, 13-21). На основу изворних ћелија које се користе за продукцију IFN-а, индуктора синтезе IFN-а, испољене цитотоксичне активности и својства неутрализације специфичним антителима извршена је **основна подела IFN-а у три класе: IFN- α , IFN- β и IFN- γ** . Као изворне ћелије за синтезу IFN-а могу се користити: леукоцити, фибробласти, активирани Т-лимфоцити. Као индуктори синтезе IFN-а најчешће се употребљавају: вируси, бактерије, митогени, лектини и др. У већини ћелија сисара ствара се **IFN- α и IFN- β** , али у неједнаким количинама, после стимулације вирусима или другим агенсима, тј. индукторима синтезе IFN-а. Дејство IFN- α и IFN- β веома је слично, готово идентично и они су разврстани у **"IFN-е типа I"** (у литератури се среће и назив **"леукоцитарни" IFN-и** према изворним ћелијама у којима испољавају своју активност). За **IFN- γ** коришћени су различити термини (нпр. **"IFN типа II"** или **"имуни IFN"**, зависно од врсте изворне ћелије и испољене активности) (1-6, 10-14, 19-24).

У другој половини двадесетог века, када је откривен IFN, многи научници су га убрајали у значајно откриће у медицини и упоређивали су га са открићем пеницилина Александра Флеминга. Сматрали су да је пронађен биотехнолошки препарат који ће зауставити размножавање вируса. "Америчка асоцијација за борбу против рака" и "Национални амерички институт за карциноме" на основу својих клиничких испитивања, седамдесетих година прошлог века, установили су изузетно антитуморско дејство хуманог интерферона-алфа (hIFN- α). Они су обезбедили велика материјална средства за набавку огромних количина hIFN- α за третман 150 пацијената са карциномом грудног коша. Cantell и сарадници, у лабораторији у Хелсинкију (Финска), прихватили су изазов за увођење масовне производње hIFN- α из суспензије леукоцита - "buffy coat"-а (БЦ) којим ће задовољити клиничке и експерименталне потребе за "супер" интерфероном (како га је Cantell назвао) у целом свету. Постојећим биотехнолошким поступком Cantell и сарадници нису успели да задовоље целокупне светске потребе за hIFN- α . Почетком седамдесетих година двадесетог века, Cantell је прорачунао да, биотехнолошким поступком који је до тада коришћен, не може се произвести довољне количине hIFN- α за клиничке и експерименталне потребе, када би се целокупне количине БЦ-а из целог света искористе у производњи hIFN- α (13, 21). Зато су многе лабораторије у свету радиле експерименте на добијању IFN- α генетским инжињерингом. То је прво пошло за руком **Taniguchi-у и сар.** (1979) који су клониране IFN-ске гене

уметнули у векторе (колоније бактерија, квасца и ћелије сисара) и увели "масовну" производњу рекомбинантног интерферона (rIFN- α) (1, 3, 10-14, 21).

Моћне фармацеутске компаније улажу огромна материјална средства у производњи rIFN- α , менаџменту и реклами на тржишту лекова. Многе земљамље су неправедно потиснуле биотехнолошки поступак производње hIFN- α за клиничку примену. hIFN-и добијени су из суспензије леукоцита која је издвојена из јединице конзервисане целе крви, не старије од 6 сати. После центрифуговања, издваја се БЦ (суспензија леукоцита и тромбоцита) (2, 25-39). Даљим поступком делеукоцитирања јединице целе крви, одбацује се суспензија леукоцита - БЦ, као нус-продукат, јер она може да изазове неповољне ефекте у хемотерапији (терапија крвљу и крвним продуктима). При извођењу биотехнолошког поступка производње hIFN- α , суспензија леукоцита - БЦ се пречишћава од еритроцитне контаминације, да би смо добили што чистију подлогу хуманих леукоцита. Том приликом пречишћена подлога суспензије леукоцита излаже се вирусној инфекцији ради стимулације синтезе hIFN- α . Различити вируси се употребљавају као **индуктори синтезе IFN- α** , али се у пракси најчешће користи "Sendai" вирус, култивисан на хорион-алантоичној мембрани пилећег ембриона. Индукција синтезе hIFN- α одиграва се на температури од +37 °C и траје 18 сати (40-46).

Постоји и могућност да се пречишћена суспензија леукоцита индукује неким "не вирусним", тј. хемијским индукторима (форбол естар, тј. 12-О-тетрадеканол форбол 13-ацетат) или антигеном (стафилококни ентеротоксин А - СЕА; пурификовани протеински дериват - ППД; тетанусни токсид; анти-лимфоцитни серум; конкавалин А-"Con A") чиме се сензитисани хумани лимфоцити подстичу на продукцију хуманог интерферона-гама (hIFN- γ). Касније се hIFN- γ пречишћава комбинацијом хроматографске процедуре или имуном преципитацијом помоћу моноклонских антитела (47-52). **У доступној медицинској литератури, до сада није забележено да је hIFN- γ добијен индукцијом пречишћене леукоцитне суспензије биљним препаратом фитохемаглутинином (ПХА).**

Постоје противуречности производних могућности биотехнологије и генетског инжињеринга, и то:

Биотехнолошким поступком се добија знатно јефтинији и биолошки најприроднији препарат hIFN- γ из јединствене сировине која је одбачена као нус-продукат. Овим биотехнолошким поступком добијају се недовољне количине hIFN- γ за клиничке и експерименталне потребе.

Генетским инжињерингом постигнута је "масовна" производња која задовољава клиничке и експерименталне потребе за $\text{rIFN-}\gamma$. Овим поступком добијају се знатно скупљи препарати $\text{rIFN-}\gamma$ чије дејство теже подносе пацијенти.

Израдом ове докторске дисертације требало би да одговорим на питање да ли се новим биотехнолошким поступком производње $\text{hIFN-}\alpha$ из пречишћене суспензије леукоцита - "buffy coat"-а може повећати количина биотехнолошких препарата $\text{hIFN-}\gamma$ из пречишћене суспензије леукоцита, и тиме задовољити наше потребе и потребе извоза, у односу на досадашњи биотехнолошки поступак!?

Да би дао одговор на ово питање, прво сам решио фундаментални проблем повећања варијабилности леукоцита, односно произведене су значајно веће количине $\text{hIFN-}\gamma$, него што су постигнуте класичним биотехнолошким поступком коришћеним код нас и у свету.

При томе се мора истаћи да овако добијени биотерапеутски продукти $\text{hIFN-}\gamma$ имају три значајне предности над $\text{rIFN-}\alpha$ -има:

1) **бољу подношљивост** (нпр. hIFN је најприроднији, биолошки најмање штетан и најмање имуноген препарат $\text{IFN-}\alpha$ на тржишту лекова. Након дужих третмана болесници изузетно ретко одговарају синтезом антитела против hIFN);

2) **уштеда у потрошњи крви** јер се суспензија хуманих леукоцита, која се одбацује као "нус"-продукат, може користи као јединствена сировина за спровођење биотехнолошког поступка продукције $\text{hIFN-}\gamma$;

3) препарат $\text{hIFN-}\gamma$ добијени продукцијом из суспензије хуманих леукоцита имају далеко нижу цену од рекомбинантних интерферона.

Израдом ове дисертације потврдио сам **троструки значај**:

- **Фундаментални значај** који се састоји у побољшању вијабилности и индукционе способности леукоцита, као и већи принос $\text{hIFN-}\gamma$;
- **Практични значај** састоји се у обједињавању производње БЦ-а из свих трансфузиолошких центара Р. Србије за производњу довољне количине пречишћене суспензије леукоцита која ће се употребити за продукцију довољних количина $\text{hIFN-}\gamma$ за наше потребе и обезбеђењу извоза у земље света у којима су препарати rIFN недоступни због недостатка финансија.
- **Научни значај** садржан је у могућности продукције $\text{hIFN-}\gamma$ индукцијом пречишћене леукоцитне суспензије биљним индуктором синтезе интерферона - фитохемаглутинином.

2. ДОСАДАШЊА САЗНАЊА

2.1. Дефиниција и основне биолошке карактеристике цитокина

На постојање неких медијатора који у одговарајућим условима делују као стимулатори стварања крвних ћелија, указано је још 1906. године (13, 52, 53). Ово откриће готово да је пало у заборав, када су 1950. године објављени резултати испитивања (13, 52) регулације еритроцитопоезе, при чему је коришћен експериментални модел хипоксије код "парабиотичких" пацова (то су експерименталне животиње међусобно повезане кожным калемом). Уочено је да хипоксија изазвана на вештачки начин код једне експерименталне животиње, доводи до стимулације еритроцитопоезе, не само код тог, него и код другог пацова. Тиме је доказано да долази до преласка неког хуморалног фактора, тј. стимулатора еритроцитопоезе, из организма једне у тело друге експерименталне животиње (13, 21). Током наредних истраживања, потврђено је да постоје и други регулатори хематопоезе, као што су стимулатори раста и функције леукоцита и тромбоцита (3, 11, 13, 21).

Данас је познато да у организму постоје бројне супстанце, посебни сигнални молекули, који су означене као медијатори или модулатори хемобиолошких процеса и у које су сврстани и **цитокени**. Неопходни су за одвијање свих фаза имуног одговора и значајно утичу на регулацију типа, јачине и дужине имуног одговора. Нема имуног одговора у организму без продукције цитокина. Њих **излучују** различите ћелије као што су **лимфоцити, моноцити, макрофаги, фибробласти**. Цитокине стварају и на њих реагују и друге ћелије, ван имуног система. **Деловање цитокина** је углавном **локално, аутокринно и паракрино**, ређе ендокрино. **Регулацију активности цитокина** у организму врше тзв. **природни инхибитори**: цитокини са антагонистичким дејством, растворљиви рецептори и антагонисти рецептора за цитокине (3-6, 113, 114).

Новија истраживања су показала да су ефекторске фазе и природног и специфичног (стеченог) имунитета већим делом посредоване протеинским молекулима, који су по функцији слични хормонима, а данас се називају цитокини (3-7, 13). **Цитокини** су по својој структури веома слични и могу се дефинисати као **мали протеински молекули**, молекулске масе од **8 до 80 кило Далтона (kD)**. Продукција ових протеин-

ских молекула је обично пролазна и добро регулисана. Захваљујући брзом развоју науке, до данас је **идентификовано преко 100 хуманих цитокина (6)**.

Цитокини се у организму понашају као снажне молекуле које се ослобађају из ћелија, транспортују се у друге делове организма где делују на функције других ћелија што доводи до бројних биолошких ефеката. **Ефекторске функције ових протеина су активација и диференцијација ћелија, хемотаксија и пролиферација широког спектра ћелија**. Активност цитокина зависи од њихове концентрације у микроокружењу и јачини експресије специфичних рецептора на површини циљне ћелија. Свака жива ћелија са једром у људском организму ствара цитокине, чија врста и количина секреције, зависи од типа, стадијума диференцијације ћелије и њеног активацијског стадијума. Стварање цитокина је стимулисано антиген специфичном активацијом Т4-лимфоцита. Појам **интерлеукин** прихваћен је за **групу медијатора одговорних за међусобно комуницирање леукоцита**. Данас је препознато **29 врста интерлеукина (IL-1 - IL-29)**. Многи од цитокина су **фактори раста ћелија**, неки су **хематопетски фактори раста**, док неки имају **антивирусну активност** и називамо их **интерферонима (IFN-има)**. Цитокини регулишу раст и диференцијацију ћелија имуног система, Т- и Б-лимфоцита и макрофага, као и обим и дужину запаљенског одговора. Модификују биолошки одговор и међусобно су повезани у цитокинску регулациону мрежу. Повећано излучивање цитокина није удружено само са инфекцијама него и са аутоимуним и неуродегенеративним болестима (5, 6, 113, 114).

Захваљујући савременој рекомбинантној технологији дошло се до сазнања да су **ефекторски цитокини у природном имунитету углавном створени од моноклеарних фагоцита и зато се често називају и монокини (5, 13)**. **Неутрофили ослобађају монокине и учествују у инфламаторним реакцијама**. Они вероватно посредују у ерадикацији бактеријских инфекција. Мада се **монокини могу стварати директно под утицајем бактерија**, они такође могу бити секретовани од стране **моноклеарних фагоцита у одговору Т-лимфоцита стимулирани антигенима**, као нпр. у специфичном имунитету. Највећи број цитокина у специфичном имунитету су произведени од стране активисаних Т-лимфоцита и такви молекули се обично називају **лимфокини (5, 13)**. **Лимфокини** као и цитокини су по хемијској структури **гликопротеини мале молекулске масе (10 - 60 kD)**, које примарно **производе лимфоидне ћелије** и играју улогу **сличну хормонима** у регулацији имуног система. Они имају **системске и локалне ефекте (4)**. Сви ови гликопротеински молекули, мале молекул-

ске масе су генерално разврстани у једну групу названу **цитокинима** (4, 13). Многи од ових цитокина су били подробно испитивани, њихови гени су били клонирани, а продукција је покренута у бактеријама или ћелијским системима сисара уз коришћење генетског инжињеринга (3, 4, 13). **Т-лимфоцити** **продукују неколико цитокина**, који служе првенствено у **регулацији раста и диференцијацији различитих популација лимфоцита** и играју значајну улогу у **активационој фази имуног одговора посредованог Т-лимфоцитима** (13).

Друге функције цитокина који потичу од Т-лимфоцита су **активација и регулација инфламаторних ћелија** (као што су **мононуклеарни фагоцити, неутрофили и еозинофили**). Они играју важну улогу у **ефекторској фази ћелијски посредованог имунитета** и одговорни су за **међућелијску комуникацију имуног и инфламаторног система** (3, 5, 13). Лимфоцити и мононуклеарни фагоцити **продукују цитокине**, као што је **фактор раста опредељених матичних ћелија хематопоезе (ЦСФ)**, који стимулише раст и диференцијацију незрелих леукоцита у коштаном сржи, чиме се попуњавају додатни извори леукоцита (3, 5). Због **полиморфности ових цитокина** које секретују неке популације леукоцита (нпр. Т-лимфоцити, или моноцити) и **њиховог деловања на друге популације леукоцита** (нпр., моноците, неутрофиле или еозинофиле), они се понекад називају **интерлеукинима** (3, 5). Овим термином нису **обухваћени само цитокини који су синтетизовани од стране леукоцита**, већ и **цитокини настали под дејством неких стимулуса на леукоците** (1, 3, 4).

Као што је већ речено, **цитокини су солубилни интерцелуларни гликопротеини** који делују као **медијатори и модулатори хемобиолошких одговора**. Њиховим посредовањем се остварује широк дијапазон **локалних и/или системских одговора**, укључујући и **имуне, проинфламаторне и хематопоезне ефекте** (1 - 4). То су **интерцелуларни сигнални молекули**. Њих **продукују и егзоцитозом ослобађају једне, изворне ћелије**, а они потом делују као **медијатори и/или модулатори активности других, тзв. циљних ћелија ("Target Cells")**. При томе, **изворне, али и циљне ћелије** могу бити одређене **имунокомпетентне или неке друге ћелије**. Ту спадају: **Т-лимфоцити и Б-лимфоцити, макрофаги, фибробласти, ендотелне, епителне и друге ћелије**, односно **одговарајући лимфохематопоезни прекурсори**. Њих **продукују изворне ћелије у ефекторној фази, након агресије патогена на организам** (1, 3). Према томе, **цитокини делују везивањем за специфине рецепторе на ћелијској мембрани, покренувши каскадни механизам који доводи до индукције, повећањем или смањењем броја цитокин-регулишких гена у ћелијским једрима** (6). Значи **већина цитокина**

је секретована (тј. излучује се у **солубилној форми**), али неки могу бити **експримирани на ћелијској мембрани**, или су **задржани у резервоарима екстрацелуларног матрикса** (3, 7, 13).

Некада се сматрало да цитокини имају један ћелијски извор, једну врсту циљних ћелија и једну специфичну улогу. Међутим, показало се да **цитокини могу имати мултипле ћелијске изворе, различите циљне ћелије, широки и по некад делимично преклапајући делокруг биолошких активности, и њихове комуникационе мреже функционишу као комплексан "језик сигнализације"** (3).

Иако се већ од раније знало за постојање цитокина, тек средином осамдесетих година прошлог века, **утврђене су физичкохемијске особине и биолошки ефекати цитокина јер су освојени поступци биотехнолошке продукције цитокина односно технологија рекомбинантне дезокси-рибонуклеинске киселине (rDNK)** (1, 3, 13).

Недавно је извршена клиничка евалуација користи и ризика терапијске употребе појединих цитокина и/или њихових антагониста у третману болесника са одређеним поремећајима или болестима, као што су, моноцитопенија или панцитопенија, тешке инфекције, нека малигна обољења и друго (1, 3).

Познате су **различите класификације цитокина**. Они могу бити разврстани према:

А) **пореклу, односно врсти изворне ћелије**, на пример, подела на **лимфокине (продукују их лимфоцити)** или **монокине (настају из моноцита/макрофага)**. Истраживачи су генерално усвојили конвенцију да се ти молекули заједнички зову **цитокини** зато што су поједини цитокини продуковани од стране многих различитих ћелијских типова (1, 3, 4);

Б) **по испољеној цитокинској активности, дејству на циљне ћелије**, деле се на **стимулаторе** или **инхибиторе** (1, 3). Већином делују на различите врсте ћелија (ово својство се назива **плеотропизам**), при чему често изазивају различите ефекте на исте циљне ћелије;

В) **према систему њихове основне активности**, могуће је разликовати **лимфохематопоезне и не-лимфохематопоезне цитокине** (проинфламаторни, антипролиферативни, имуномодулаторни, хемотаксни и други) (1, 3).

Најприхватљивијом се чини **подела цитокина у шест посебних категорија**, а то су:

- **фактори раста матичних ћелија хематопоезе** (плурипотентних и одређених);
- **интерлеукини (IL);**
- **интерферони (IFN);**
- **фактор некрозе тумора (TNF);**
- **фактор трансформације раста (TGF);**
- **остали фактори раста.**

Због **полиморфности цитокина, развијене технологије rDNK и могућности клонирања њихових гена, номенклатура цитокина је доста сложена**. Цитокини често утичу на синтезу других цитокина, руководећи се каскадама у којима други или трећи цитокин може бити индукован и посредовати у биолошким ефектима првог цитокина. Способност једног цитокина да повећа или супримира продукцију других, може имати утицаја на важне позитивне и негативне регулаторне механизме (за имуни и инфламаторни одговор) (1, 3). **Номенклатура хуманих цитокина приказана је у табели 1** (13, 21).

T4-лимфоцити или "**помоћни**" T-лимфоцити (Th) и њихови цитокини су главни регулатори имунолошке реакције. Хумани имуни одговор на инфекцију регулисан је равнотежом између Th1-цитокина (**IL-2, IFN- γ**) и Th2-цитокина (**IL-4, IL-5, IL-10**). T4-лимфоцити специјализовани су у препознавању интрацелуларних патогена или њихових продуката, активацији макрофага, осталих T-лимфоцита, B-лимфоцита и **NK ћелија** (ћелија "природних убица"). Могу уништити циљне ћелије као што су инфицирани моноцити и макрофаги, помоћу "Фац-Гац" лиганада ("ФацЛ"). У савременој медицинској пракси, разликујемо проинфламаторне и антиинфламаторне цитокине. Инфламаторни цитокини укључујући (**TNF- α , IL-1 β и IL-6**), активирају коагулацију и инхибирају фибринолизу што може изазвати дифузна оштећења ендотела капилара, с последичном дисфункцијом бројних органа и **поремећеном апоптозом** ("програмираном ћелијском смрћу"). Данас је познато да постоји интеракција између хемостазе, упалних реакција и имуног система, а исто тако знамо да имунокомпетентне ћелије и ендотел крвних судова међусобно утичу једно на друго. Имуни одговор почиње фазом препознавања **антигена** и завршава фазом одбране организма од патогена. У овој реакцији поред имуних ћелија учествују и цитокини које оне луче (13).

Табела 1. Номенклатура хуманих цитокина (13, 21)

НАЗИВ ЦИТОКИНА	СКРАЋЕНИЦЕ	НАЗИВ И ТИПОВИ ЦИТОКИНА
ФАКТОРИ РАСТА ПЛУРИПОТЕНТНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА ХЕМАТОПОЕЗЕ	FL SCF (KL или SLF)	FL ("Flk2/FL3 ligand"); SCF ("stem cell factor") или KL ("c-kit ligand") или SLF ("steel factor");
ФАКТОРИ РАСТА ОПРЕДЕЉЕНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА ХЕМАТОПОЕЗЕ	EPO, CSF и TPO	EPO (еритропоетин); G-CSF (фактор раста гранулоцитопоезе); GM-CSF (фактор раста грануло-моноцитопоезе); M-CSF (фактор раста моноцитопоезе); TPO (тромбопоетин)
ИНТЕРЛЕУКИНИ	IL - 1 IL - 2 IL - 3 IL - 4 IL - 5 IL - 6 IL - 7 IL - 8 IL - 9 IL - 10 IL - 11 IL - 12 IL - 13 IL - 14 IL - 15 IL - 16 IL - 17 IL - 18	IL - 1 α IL - 1 β
ИНТЕРФЕРОНИ	IFN	IFN - α IFN - β IFN - γ IFN - Ω
ФАКТОРИ НЕКРОЗЕ ТУМОРА	TNF	TNF - α TNF - β
ФАКТОРИ ТРАНСФОРМАЦИЈЕ РАСТА	TGF	TGF - β 1 TGF - β 2 TGF - β 3
ОСТАЛИ ФАКТОРИ	LIF (инхибиторни фактор леукемије) MIF (инхибитор миграције макрофага) SCI (инхибитор стем ћелија и други).	

Заједничка својства цитокина су:

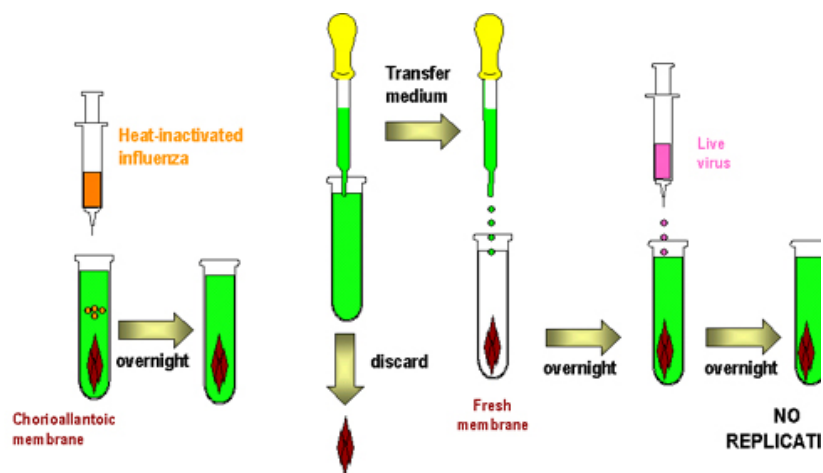
- углавном делују локално аутокрино и паракрино, ретко ендокрино;
- своју активност испољавају везујући се за специфичне рецепторе на површини циљних ћелија или ткива;
- једна ћелија може да производи више цитокина;
- различити типови ћелија могу да произведу исте цитокине;
- један цитокин може да делује на више различитих типова ћелија;
- више различитих цитокина може да испољи исту активност;
- један цитокин може да индукује или инхибира продукцију других цитокина;
- један цитокин може да потенцира (синергизам) или инхибира (антагонизам) дејство другог цитокина (113).

2.2. Историјат открића и развоја сазнања о интерферонима

IFN-и су породица индукованих протеина (гликопротеина) које синтетизују и секретују ћелије имуног система (леукоцити, фибробласти) еукариота у одговору на вирусну инфекцију и бројне друге стимулусе, назване **индусери** (бактерије, антигени, тумори, страни макромолекули, метаболички активатори и инхибитори). Секретовани IFN-и стимулишу суседне ћелије да продукују друге протеине који регулишу вирусну репликацију, имуни одговор, ћелијски раст и друге ћелијске функције. IFN-и омогућавају "комуникацију" између ћелија у циљу покретање заштитне одбране имуног система, која има за циљ да уклони или спречи даље дејство патогених фактора или тумора. Иако је њихова главна способност да се "мешају" са репликама вируса унутар ћелије домаћина, IFN-и имају и друге функције којим активирају имунске ћелије, као што су ћелије задужене за природни имунитет и макрофаги. Тиме IFN-и повећавају способност ћелија домаћина да се одупру инфекцији вируса или другим патогеним факторима (13, 116).

Интерферон су открили **Alick Isaacs** и **Jean Lindenmann** 1957. године. Они су размножавали топлотом инактивирани вирус инфлуенце у ћелијама хорион--алантоичне мембране пилећег ембриона. Доказали су отпорност на инфекцију вирусом инфлуенце, при излагању истог ткива инфективном хомологом вирусом. Запазили су да је медијум, у којем се налазио размножен вирус инфлуенце, може да заштити друге ћелије од виру-

сне инфекције уколико је пренет у ново хомологно ткиво. У почетку су сматрали да је у питању појава имунолошког феномена названог "интерференција". Код феномена "**интерференције**" када се у ћелији нађе један вирус, он не дозвољава размножавање другог вируса у истој ћелији. Касније, када су медијум ослободили вируса и поново га додали новим ћелијама, а затим инокулисали исти вирус инфлуенце у ћелије, запазили су да није дошло до размножавања вируса. На њихово велико изненађење констатовали су да се у медијуму налази нека супстанца коју су излучиле ћелије хорион-алантоичне мембране пилећег ембриона. Ова супстанца била је у стању да заштити нове ћелије од вирусне инфекције. Тада су претпоставили да се појава "интерференције" одвија посредством неког фактора који би својим биолошким дејством, онемогућавао јављање вирусне инфекције инхибицијом вирусне репликације. Убрзо су **Isaacs** и **Lindenmann (1957)** доказали присуство протеинског фактора са антивирусним дејством кога су назвали **интерферон (IFN)** и дефинисали га као **солубилни фактор пилеће хорион-алантоичне мембране, која је била изложена инактивном вирусу инфлуенце** (13, 15-21, 46-8, 53-9). Читав поступак открића IFN-а приказан је у слици 1.



The Discovery of Interferon

From Isaacs and Lindenmann, Proc. Roy Soc B, 1957

Слика 1. Поступак открића IFN-а A. Isaacs-а и J.Lindenmann-а (116)

Lindenmann и сарадници (1957), после открића **IFN-а**, доказали су да је по хемијској структури **протеин** јер се може разлагати протеолитичким ензимима. Они су пошли од сазнања да инкубација вируса са IFN-ом није имала ефекта на вирулентност вируса и дошли су до закључка да **IFN не делује директно на вирус**, већ **делује на ћелије**. Унесен у културу ћелија, која претходно није излагана вирусу, IFN је био способан да пренесе **стање отпорности на вирус**. На тај начин интерферира са

каснијом репликацијом вируса. То се доказује чињеницом да се у њој вируси не могу даље репликовати (13, 60-2).

Насупрот томе, после вишечасовне инкубације новопронађене супстанце са вирусом, инаktivација вируса је изостала, а вирус се неометано размножавао у ћелијама културе ткива. Овим експериментом доказано је да IFN не делује директно на вирус нити га везује за себе. **Антивирусни ефекат** нове супстанце оствариван је једино у условима претходног довођења ћелија у контакт са супстанцом неколико часова на +37 °C. **Ефекат инхибиције репликације вируса** објашњен је метаболичким процесима који се одигравају у ћелијама за време инкубације са IFN-ом. Наиме, у инфицираним ћелијама IFN индукује стварање других протеина који спречавају репликацију вируса (13, 60, 61).

Tyrrel (1959) је увео концепт "**специес специфичности**", односно да је IFN **специфичан за врсту** (11, 13, 63), на основу запажања да IFN добијен из ћелија хорион-алантоичне мембране пилећег ембриона не испољава антивирусно дејство на ћелије говечета и обрнуто. **Закључио је да је IFN активан само у културама ћелија у којима је настао, испољава специфичност у односу на животињску врсту, али не и на одређену специфичност вируса.** Без обзира на врсту вируса којим су били стимулирани, IFN-и су испољавали активност против већег броја различитих типова вируса (11, 13, 60-3). Тада су дошли до сазнања да не постоји само један IFN, већ **фамилија IFN-а** са заједничким, али и различитим својствима и биолошким активностима (13, 63). Након тога, огроман број истраживача посветио се изучавању IFN-а. Приликом истраживања, показало се између осталог да су молекули IFN-а јако комплексни, са различитим функцијама и активностима у организму и припадају **суперфамилији цитокина**. Овим истраживањима доказано је да IFN-и имају многоструку улогу у организму и много већу важност него што се у почетку могло и претпоставити (11, 13).

Касније је доказано да и други агенси, поред вируса, могу индуковати синтезу IFN-а. Као одговор на извесне бактеријске продукте и хемијска средства ниске молекулске масе, јавља се синтеза IFN-а. Као резултат ових испитивања закључено је да и неке невирусне супстанце могу бити употребљене за покретање стварања IFN-а *in vitro* и *in vivo*. Ови агенси названи су **индусери** јер изазивају стварање IFN-а у културама ћелија човека и других животињских врста. У групу индусера, поред вируса, спадају: ендотоксини, полисахариди, бактерије, рикетије, протозое, као и нека синтетска једињења мале молекулске масе (15-8, 44, 46, 47, 58).

Ако се сагледа временско раздобље, од открића IFN-а (1957) до данас, може се поделити у три периода (21). **Први период у историјату испитивања IFN-а**, траје од открића IFN-а, Isaacs-а и Lindenmann-а (1957), до средине шездесетих година прошлог века. У том периоду се сматрало да је антивирусна активност једино својство које су испољавали IFN-и у организму и развијане су само студије у којима је испитивана антивирусна активност IFN-а. Значајно запажање у овим студијама је чињеница да постоји не једна, већ више класа hIFN-а. Још тада је пронађено да, зависно од места синтезе IFN-ских протеина, постоје три различита типа IFN-а: први који се ствара првенствено у леукоцитима (данас познат као **IFN- α**); други се синтетише преодминантно у фибробластима (**IFN- β**) и трећи тип кога стварају стимулирани лимфоцити (**IFN- γ**) (21).

То је основ за каснија открића фамилије IFN-ских гена који кодирају IFN-е (21). **Прву класу IFN-а** стварају првенствено леукоцити (раније назван "**леукоцитарни IFN**", а данас се означава као **IFN- α**). **Друга класа IFN-а** преодминантно се синтетише у фибробластима (**IFN- β** или раније назван "**фибробластни IFN**"). Ове две класе IFN-а су разврстане у **тип I IFN-а**. **Трећа класа IFN-а** се ствара у стимулираним лимфоцитима (**IFN- γ** , "**имуни**" или **тип II IFN-а**). Још тада је установљено да нормалне ћелије обично не синтетишу детектабилне количине IFN-а, али и да вирусна инфекција може бити индукциони агенс за синтезу IFN-а у ћелијама (15, 46, 47). Онда су у одвојеним истраживањима (21) Heller, Taylor, Wagner, Friedman и Connabend доказали да индукција интерферонске синтезе захтева синтезу обе месенџер рибонуклеинске киселине (RNK и DNK) у IFN-ском протеину. У посебно изведеном експерименту била је показана инхибиција репликације инокулисаног вируса (који је био у стању нормалне репликације) у ћелијским културама, које су претходно истовремено третиране интерфероном и актиномицином Д. Ови експерименти доказали су да IFN није стварни антивирусни агенс, већ да првенствено индукује "антивирусно стање" као резултат индукције неких сигналних протеина или протеина који су стварни чиниоци инхибиције размножавања вируса (21).

Након тога, уследио је покушај да се дефинише "антивирусно стање" као инхибиција интерфероном оба, и RNK-вируса и DNK-вируса. **Joklik** је указао на заједничку функцију циклуса размножавања обе ове класе вируса код којих би била инхибирана транслација ране вирусне месенџер RNK (RNK у "родитељским" вирусним честицама у случају RNK вируса и транскрибованих из "родитељских" RNK вирусних

генома за све друге вирусе. Ова предвиђања указују на постојање антивирусног стања у случају "vakcinija" вируса и бројних других испитаних система (21).

Gresser (1961) је вршио истраживања на основу претпоставке да IFN продукован из хуманих леукоцита *in vivo* доприноси природној одбрани организма од вирусне инфекције (16-9, 56, 57) употребивши хумане леукоците из периферне крви као потенцијални извор за производњу IFN-а. Ова његова претпоставка потврђена је приликом каснијих испитивања. Подстакнут ранијим Gresser-овим испитивањима, **Alics Isacs** (1962) је потврдио његове претпоставке и у својим истраживањима разматрао могућност употребе хуманих леукоцита за широку и рутинску продукцију IFN-а. Први експерименти на добијању IFN-а из хуманих леукоцита урађени су марта 1963. године. У првом периоду рађени су експерименти на добијању и пречишћавању IFN-а само из ћелија хорион-алантоичне мембране пилећег ембриона. Тада је принос IFN-а био веома низак, али већ у првом експерименту са хуманом леукоцитном суспензијом, принос IFN-а био је око десет пута већи од приноса који је добијен са другим хуманим ћелијама (63, 64).

Cantell је са сарадницима (41, 42) прихватио изазов за увођење "масовне" производње IFN-а из суспензије леукоцита - "buffy coat-a" (БЦ). БЦ се и данас користи у многим лабораторијама као полазна сировина за производњу hIFN- α (13, 21, 65). У наредних пет година лабораторија у Хелсинкију на челу са Cantell-ом који је говорио да ће направити "супер интерферон", била је носилац систематских студија у покушају да се направи задовољавајући принос IFN- α из хуманих леукоцита (41, 42). У овом периоду и друге лабораторије су анализирале факторе који су од утицаја на продукцију hIFN- α добијеног из суспензије леукоцита (54, 55, 64).

Други период у развоју истраживања на hIFN-у трајао је од средине шездесетих до средине седамдесетих година двадесетог века. У том периоду огроман напор посвећен је техници пречишћавања (пурификације) hIFN-а (21) са натријум додецил сулфатом (СДС) и омогућена је употреба СДС-полиакриламид гел елетрофорезе као моћног поступка у пречишћавању IFN-а. Овај поступак пречишћавања IFN-а показао је неочекиване потешкоће у извођењу пречишћавања hIFN-а (21, 64, 66-73). Тада је доказана изванредно висока биолошка активност IFN-а. Тако је утврђено да мање од 50 молекула IFN-а по ћелији успоставља антивирусно стање. Мада то доказује да није проблем у продукцији милиона јединица hIFN-а из суспензије леукоцита или културе ћелија. У овом периоду дошло је до открића да IFN осим антивирусне ак-

тивности поседују и инхибиторну активност ћелијске мултиплеклације (ЦМИ) и ћелијску регулаторну активност. Том приликом дошло се до сазнања да hIFN испољава велики број биолошких ефеката који се нису доказали због недостатку пречишћеног hIFN-а (13, 21, 65). Значајне студије у овом периоду показале су да **постоји више врста хуманих интерферона** и ово је била основа за наредна открића фамилија интерферонских гена. Ове технике су показале пресудан утицај пречишћавања IFN-а са изванредно осетљивм натријум додецил сулфатом (СДС), који дозвољава употребу СДС-полиакриламид гел електрофорезе као моћног средства у пурификацији IFN-а. У овом периоду, вршено је садржајно испитивање и било је везано за биохемијска испитивања како IFN може инхибирати транслацију вирусне месенџер RNK (m RNK). Успешним биохемијским испитивањима дошло се до резултата о успешном деловања IFN-а на инхибицију транслације mRNK. Било је већ познато да IFN делује преко индукције различитих протеина/ензима и откривена су **два веома интересантна система деловања IFN-а**, која су везана за деловање малих количина дволанчане RNK (ds RNK), а то су: **"2'5'-олиго аденилат систем" (2'5'-ОА-систем)** и **"67-kD протеин киназа систем" (67- kD ПК систем)**. Међутим, дефинитиван доказ да су ова два система укључена директно и селективно у инхибицију вирусног умножавања још нису била испитана (21).

Средином шездесетих година прошлог века, бројни истраживачи дошли су до сазнања да IFN инхибира развој различитих врста карцинома код експерименталних животиња (17-23, 65), и његова примена има **повољан ефекат** у третману **остеосаркома, мултиплог мијелома, меланома, карцинома грудног коша и одређених типова леукемија и лимфома у људи** (13, 17, 21-3, 65).

"The American Cancer Society" и "USA National Cancer Inctitute" обезбедили су 2 милиона долара за набавку око 40 билиона интернационалних јединица (IU) hIFN- α и клинички третман 150 пацијената оболелих од карцинома грудног коша за период од два месеца. **Cantell** је са сарадницима (41, 42) прихватио изазов за **увођење масовне производње IFN-а из суспензије леукоцита - "buffy coat-a" (БЦ)** који се користио за припремање препарата концентрованих тромбоцита. Преостала суспензија леукоцита одбацује се као штетан "нус"-продукат који може да изазове неповољне ефекте хемотерапије (терапија крвљу и крвним продуктима). У наредних пет година, у лабораторији у Хелсинкију, Cantell и његови сарадници покушали су да направе "супер" интерферон који би дао задовољавајући принос hIFN- α из суспензије хуманих леукоцита да би се

задовољиле експерименталне и клиничке потребе у целом свету (41, 42). Поред свих напора Cantell-ове лабораторије да обезбеди довољне количине IFN-а за експерименталне и клиничке потребе у целом свету (13, 21, 65), постојећом технологијом није се успело (41, 42, 65). Тада је Cantell проценио да ако се искористи сва крв од добровољних давалаца из целог света за производњу БЦ-а, не би се добиле довољне количине IFN-а за задовољење целокупних светских потреба за терапијске и експерименталне потребе. У то време и у другим лабораторијама вршене су анализе фактора који су од утицаја на продукцију hIFN- α добијеног из суспензије хуманих леукоцита (54, 55, 64). БЦ се и данас користи у многим лабораторијама као полазна сировина за производњу hIFN- α (13, 21, 65).

Од 1970. године процесирање јединица конзервисане целе крви било је усавршено. Од тог времена БЦ је био признат као најбитнији извор за добијање hIFN- α (65-73). Једино су Хелсиншка лабораторија и Soloviev-а лабораторија у Москви имале висок ниво продукције hIFN- α у жељеним серијама. На основу дотадашњих испитивања дошло се до закључка да просторије које се користе за продукцију hIFN- α морају бити наменске. Не смеју се користити за производњу IFN-а, просторије које су коришћене за припрему компонената од крви. У Совјетском Савезу настављена су испитивања на продукцији hIFN- α из суспензије хуманих леукоцита, а у другим лабораторијама рад на производњи hIFN- α из суспензије хуманих леукоцита није унапређиван. Крајем седме деценије двадесетог века, принос hIFN- α био је прилично низак (41, 57, 58, 65). У то време Jan Vilček и Edward Havell (1975) у својим истраживањима (21, 65) дошли су до сазнања да постоје више врста hIFN- α , као и да се IFN добијен из хуманих леукоцита разликује од IFN-а који продукују фибробласти (ћелије везивног ткива). Они су открили да су сви IFN-и, било да су хуманог или другог порекла, по хемијској структури гликопротеини са молекулском масом од 15 до 20 kD (13, 15, 18, 21, 46, 47).

Неки истраживачи идентификовали су трећу групу hIFN-а и назвали је "Т", тј. hIFN- γ , или имуни IFN пошто је добијен продукцијом Т-лимфоцита имуног система. Седамдесетих година прошлог века су урађени први покушаји продукције hIFN- γ вирусном индукцијом Т-лимфоцита, али се у истраживањима на продукцији hIFN- γ није отишло далеко јер је убрзо наступила "ера" генетског инжињеринга и "масовне" производње рекомбинантног интерферона гама (rIFN- γ) (13, 21, 121-4).

У трећем периоду истраживања IFN-а, који је трајао од седамдесетих година двадесетог века па све до данас, појавиле су се потребе за новим клиничким студијама. Оне су захтевале веће количине IFN-а, које су надмашивале стварне количине произведене из суспензије хуманих леукоцита. Многобројне лабораторије су покушавале да **клонирају хумане IFN-ске гене**, а **1979. године Taniguchi и сарадници успешно су овладали овом технологијом** (13, 21, 65) и доказали да хумани геном садржи бројне IFN- α гене и псеудогене, IFN- β ген и IFN- γ ген. Ове гене су поређали по одређеном редоследу и доделили су им специфичну хромозомску локацију у хуманом геному, уметнувши их у прокариотичне и еукариотичне експресионе векторе. Том технологијом дошло се до производње IFN-а у великим колочинама у бактеријама, квасцу и ћелијама сисара.

Почетком деведесетих година прошлог века **генетским инжињерингом клонирани су IFN-ски гени**, односно компјутерски контролисаним култивационим процеси-ма на културама бактерија *escherichia coli* изазвана је продукција hIFN- α (74). Генетски инжињеринг обезбедио је и добијање **хибридних IFN-ских гена** који могу пронаћи специфичну примену у клиничкој пракси и тиме би могли да се употребљавају за контролу болести (13, 21).

Данас се у научним круговима поклања велика пажња биотехнологији у производњи hIFN-а. У прилог томе говори и чињеница да је 2006. године **др Sidney Peteska** добио престижну награду, а доделила му је фондација "Lemelson - MIT" за животно дело и огроман допринос у биотехнологији, хроматографском пречишћавању hIFN-а у фармацеутској индустрији, као и због огромног доприноса у развоју антивирусног третмана hIFN-ма код хепатитиса типа Б и Ц, мултипле склерозе, канцера, као и успешног лечења код многих тешких болести (13, 16, 18, 20-23, 64, 75).

Због својих изванредних особина, а на основу досадашњих испитивања, IFN многи убрајају у веома значајно откриће нашег времена у медицини. Упоредјују га са открићем пеницилина и сматрају да је пронађен биотехнолошки препарат који ће моћи да заустави размножавање вируса као што је пеницилин имао изванредно дејство на бактерије (12, 16 - 21).

Поред напретка фармацеутске технологије и разноврсне палете модерних терапеутских препарата, IFN је један од најзначајнијих терапијских средстава у лечењу хепатитис Ц инфекције (76), као и један од моћних терапеутских средстава у раном третману карцинома (77).

Савремена технологија и вртоглави напредак генетског инжињеринга нису успорили развој биотехнологије. Биотехнологија је дефинисана као наука која користи живе организме или жива ткива да кроз биотехнолошке процедуре произведе биотерапеутска једињења. "Агенција за храну и лекове" у Сједињеним америчким државама, почетком двадесет првог века, формирала је "ИПРО" тим стручњака са задатком да направе пројекат продукције биотерапеутских једињења IFN-ских протеина, као анти-вирусних гликопротеина, из ћелија оваријума кинеског хрчка. Данас постоји листа биотерапеутских једињења са скоро 500 биотерапетских продуката који су признати од стране горе споменути агенције или се налазе у глобалном развоју, а потребе за терапијски ефикасним биотерапеутским средствима је очигледна и све већа. На тој листи биотерапијских продуката водеће место заузимају IFN- γ ("Acctimmune®") и IFN- α ("Intron A®") (75).

2.3. Типови IFN-а и њихова индукција

Фамилију интерферона чини велики број посебних врста IFN-а који се међусобно разликују:

- а) по месту синтезе (леукоцити, фибробласти, Т лимфоцити, NK ћелије);
- б) начину индукције, тј. индуктору синтезе IFN-а (вируси, антигени, митогени, лектини);
- в) испољавању цитокинске активности;
- г) физичко-хемијски особинама;
- д) антигенским специфичностима, и
- ђ) својствима неутрализације специфичним антителима.

Основна подела IFN-а је на посебне антигенске типове, а могу се класификовати сходно примарној ћелији из које потичу као и према стимулансу који их индукује. Сви IFN-и су према овим критеријумима сврстани у два типа: IFN типа I (вирусни тип IFN-а) и IFN типа II (имуни тип IFN-а), а подела ова два типа IFN-а извршена је на основу антигенске специфичности у три класе. У IFN типа I спадају две класе IFN-а: IFN- α (леукоцитни) и IFN- β (фибробласни); а у IFN типа II убраја се IFN- γ (имуни тип IFN-а) (3, 13, 19-21, 48, 65). IFN-и једне класе имунолошки се разликују од IFN-а других класа, што је доказано чињеницом да серум са антителима на IFN-е једне

класе не може неутралисати IFN-е других двеју класа (24). Карактеристике hIFN су приказане у табели 2 (21).

Табела 2. Карактеристике хуманих IFN-а према B. Fields -у (21)

Т И П	IFN-α (леукоцитни)	IFN-β (фибробластни)	IFN-γ (имуни тип IFN-а)
Створен помоћу индукционог агенса	Периферни леукоцити вирусна инфекција ds RNK	Фибробласти вирусна инфекција ds RNK	Лимфоцити митогени (несензитисани специфични антигени лимфоцита) -сензитисани лимфоцити-
Број гена	Најмање 15 функционалних и 9 псеудогена	1	1
Присуство интрона	Не	Не	3
Хромозомска локација	9	9	12
Величина прекурсор- ског полипептидног ланца (број аминокиселина)	166	166	166
Дужина сигналне секвенце (амино киселина)	23	21	20
Величина активног протеина (број аминокиселина)	143	145	146
Да ли је гликопротеин?	Не	Да	Да
Стабилност на рН 2	Да	Да	Не
Молекулска маса	16-27 кD	20 кD	15-25 кD
Активност у присутном СДС- полиакриламид гелу	Да	Да	Не

Продукција IFN-а строго је контролисана генима. Информације за синтезу IFN-а смештене су у DNK ћелијског једра, односно у геному ћелија. Експресија IFN-ских гена обично је у репресији, тако да **нормалне ћелије не синтетишу IFN.** Уласком вируса или неког индуктора синтезе IFN-а, ова генетска функција ћелије се активира и покреће сложен механизам депресије IFN-ског гена. У случају да дође до интеракције два вируса, долази до "интерференције". Први вирус који је инфицирао ћелију активира генетску функцију ћелије да ствара IFN. Насупрот томе, **ниски нивои IFN-а детектују се у неким хуманим ћелијама и у видном одсуству специфичног индуктора.** Није јасан прави разлог детекције тако ниских нивоа IFN-а у неким хуманим ћелијама. Поставља се питање да ли је разлог томе константно присуство неких индуктора синтезе IFN-а или преуређење контролних региона гена за IFN. Физиолошки одговор који је откривен у експериментима на неинфицираним мишевима и у њиховим органима у којима су детектовани сигнификантни нивои протеина (индукованих IFN-ом) назива се **Восси-ева спонтана продукција IFN-а.** То се одвија преко система: 2'5' олигоаденилат синтетазе, Mx протеина и p67 кD киназе. Синтеза IFN-а преко споменутих система у **Восси-евом феномену** потврда је *in vivo* синтезе IFN-а и у одсуству специфичних индуктора. Спонтана продукција IFN-а је од теоријског, али не и од практичног значаја због малих количина ослобођеног IFN-а (13, 21, 78).

Према новијој номенклатури (115, 117-9) дата је подела IFN-а према типу рецептора преко којег преносе свој сигнал и описане су три главне класе IFN-а код људи:

Интерферон типа I: сви типови IFN-I вежу се на специфичан ћелијски рецептор који се назива **IFN-α рецептор**, и састоји се од **IFNAR1** и **IFNAR2** ланца. **IFN-α, IFN-β и IFN-ω су интерферони типа I присутни у човека.**

- **Интерферон типа II:** веже се на рецептор **IFNGR**. Код људи то је **IFN-γ.**
- **Интерферон типа III:** сигнал се преноси преко **рецепторских комплекса** који се састоји од **рецептора IL10R2** (назива се и **CRF2-4**) и **рецептора IFNLR1** (назива се и **CRF2-12**) (115, 117-9).

Хумани интерферони типа I (117) су велика и растућа група IFN-ских протеина. Сви IFN-и тип I везују се за специфичан рецепторски комплекс на ћелијској мембрани познат као **IFN-α рецептор (IFNAR)** који се састоји од **IFNAR1** и **IFNAR2** ланца. Хомологни молекули са типом I IFN-а су нађени у многим врстама, укључујући све сисаре, као и код неких врста птица, рептила, амфибија и риба (115, 117).

IFN- α протеине производе **леукоцити**. Они углавном функционишу као део одговора урођеног имуног система на вирусне инфекције. Постоји **14 подтипова IFN- α** , и називају се: **IFN-A1, IFN-A2, IFN-A4, IFN-A5, IFN-A6, IFN-A7, IFN-A8, IFN-A10, IFN-A13, IFN-A14, IFN-A16, IFN-A17, IFN-A21**. Гени за **IFN- α** молекуле груписани су на **хромозому 9**. **IFN- α** се такође прави синтетички. Постоје два типа **IFN- α** :

- **Пегилирани интерферон алфа-2а (IFN- α 2а);**
- **Пегилирани интерферон алфа-2б (IFN- α 2б)**

IFN- β протеини производе у великим количинама фибробласти. Они имају антивирусну активност, углавном у оквиру урођеног имуног одговора. До сада су откривена два типа **IFN- β** : **IFN- β 1 (IFN-Б1)** и **IFN- β 3 (IFN-Б3)** (ген означен са **IFN- β 2** је заправо **IL-6**).

Од осталих новооткривених типова **IFN-а (IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- τ , и IFN- ζ)** изгледа да постоји само једна изоформа код људи, **IFN- κ (IFN-капа)**. Само **преживари** кодирају **IFN- τ (IFN-тау)** и **IFN- ω (IFN-омега)** варијанту. До сада, **IFN- ζ (IFN-зета)** је нађен **само код мишева**, док је структурни хомолог, **IFN- δ (IFN-делта)** нађен у разноврсном низу **плацентарних сисара** који нису примати и глодари. Већина али не сви плацентарни сисари кодирају функционалне **IFN- ϵ (епсилон)** и **IFN- κ (IFN-капа)** гене.

IFN- ω (IFN-омега), мада је само једна функционална форма описана до сад (**IFNW1**), постоји неколико **псеудогена: IFN-WP2, IFN-WP4, IFN-WP5, IFN-WP9, IFN-WP15, IFN-WP18 и IFN-WP19** код људи. Многи плацентални сисари који припадају врсти непримата изражавају више **IFN- ω (IFN-омега)** подтипова.

Подтип IFN- ν (IFN-ни) типа **I IFN-а** је недавно био описан као **псеудоген код људи**, али је потенцијално функционалан у геному домаће мачке (117).

Хумани интерферони типа I породица су хомологних цитокина која је првобитно идентификована због своје антивирусне активности, а касније су откривена и антипролиферативна и имуномодуларна својства ове групе **IFN-а**. Њихова активност строго је генетски контролисана и то код људи на хромозому 9, а код мишева на хромозому 4 (120). У блоку гена који **кодирају активност хуманих интерферона типа I** више интерферон- α гена и један **интерферон- β ген**. Типови гена који кодирају хумани интерферони типа I описани су као **интерферон-омега (IFN- ω)**, мишији лимитирани ген; као и гени који су пронађени и код људи и код мишева **интерферон-**

епсилон (IFN-ε), интерферон-капа (IFN-κ) и интерферон тау (IFN-τ). Код људи, најмање 13 типова IFN-α транскрипцијом су кодиране протеинске секвенце интерферона типа I. Два гена од ових који кодирају хумане интерфероне типа I идентични су (IFN-A1 и IFN-A13) у кодирању протеинских секвенци једне врсте IFN типа I. Структура IFN-ских гена разликује се и до 8% и они доводе до синтезе 12 подтипова IFN-а типа I. Слично томе, један IFN-β и 12 IFN-α гена описани су код мишева (120). Гени за синтезу хуманих IFN-а су на хромозомима 2, 5 и 9, а за IFN-γ на хромозому 12 (115).

Сви подтипови IFN-α и IFN-β структурно су слични и деле заједничке рецепторе ћелијске мембране, који се састоје од два ланца означена као IFNAR1 и IFNAR2. Код људи, само један IFN-α подтип је N-гликозилиран и неколико IFN-α подтипова су показали да су O-гликозилирани. На глобалном нивоу, гликозилирани IFN-α подтипови не разликују се од негликозилираних подтипова у смислу њихове биолошке активности. Различите студије су показале да се ови IFN-α подтипови преклапају, али да поседују и јединствене карактеристичне биолошке активности, као и карактеристике по којима се разликују (120).

IFN-α стварају моноцити /макрофаги и Б-лимфоцити који су стимулирани вирусном инфекцијом, бактеријама и њиховим продуктима и туморским ћелијама. IFN-β стварају претежно фибробласти, епителне ћелије и макрофаги у одговору на вирусе и друге стране нуклеинске киселине. IFN-γ продукују активисани Т-лимфоцити CD4⁺, CD8⁺ и ћелије фактора некрозе тумора (NK ћелије) (3-6, 10-3). IFN-α и IFN-β показују одређену структурну и функционалну сродност, па су зато означени као тип I IFN-а. Већина IFN-а типа I одликује постојаност на pH 2. IFN-γ је једини представник типа II IFN-а и непостојан је на pH 2. Својство постојаности у киселој средини користи се за идентификацију IFN-γ (13, 16, 19).

Осим ових дефинисаних класа IFN-а, описано је неколико додатних типова IFN-а. Хумани лимфоцити продукују неке подврсте hIFN-α непостојане у киселој средини. Ацидолабилна форма hIFN-α нађена је у серуму оболелих од AIDS-а (синдром имуне дефицијенције) и код особа са поремећајем имуног система (синдром еритемског лупуса - SLE; реуматоидни артритис - RA и пемфигус). У хуманим мононуклеарним леукоцитима нађени су атипични hIFN-и (стимулисани фитохемаглутинином), поседују неке главне карактеристике класичног hIFN-α и испољавају антивирусну активност једино у хуманим фибробластима са трисомијом на 21 хромозому. Разликује се од претходно

идентификованих типова hIFN-a у антигенским, биолошким и физикохемијским својствима. Посебно треба истаћи да, неке необичне врсте hIFN-a неутралишу у истом степењу и anti-IFN- α и anti-IFN- β антитела и нађене су у вирусом инфицираним амнионским мембранама. Постоји могућност да ове врсте IFN-a имају улогу током ембрионалног развоја и у имуној толеранцији мајке према фетусу (13, 21).

Интерферон тип II (118) група IFN-a има једног члана који се зове IFN- γ . Завршени IFN- γ је анти-паралелни хомодимер, који се везује за IFN- γ рецепторски (IFNGR) комплекс да би побудио сигнал у циљној ћелији. IFNGR се састоји од две подјединице, IFNGR1 и IFNGR2.

IFN- γ има удела у регулацији имуног и инфламаторног одговора; код људи, постоји само један тип интерферона гама. Њега производе активирани Т-лимфоцити и NK ћелије (ћелије природне убице). IFN- γ има одређене антивирусне и антитуморске ефекте, али су они углавном слаби. Међутим, овај цитокин потенцира ефекте тип I интерферона. IFN- γ ослобођен од стране Th1 (T-"helper") лимфоцита. IFN- γ убрзава сакупљање ("атаксију") леукоцита на место инфекције, што се јавља код појачане упале. Он такође стимулише макрофаге да "убију" бактерије које су биле фагоцитоване. IFN- γ ослобођен од стране Th1 (T-"helper") лимфоцита је исто тако важан у регулацији Th2 ("respons") лимфоцита (лимфоцити који "препознају" инфекцију). Пошто је IFN- γ витално имплициран ("уплетен") у регулацију имуног одговора, његова продукција може да доведе до аутоимуних поремећаја. Хомологни протеини IFN- γ нађени су код птица, жаба, и телеост риба. Одатле следи да вероватно све коштане рибе/тетраподи кодирају IFN- γ . Структура IFN- γ гена је идентична са структурно повезаним цитокинима, осим што интрон између трећег и четвртог ексона не постоји. Наиме, многе телеост рибе кодирају два различита IFN- γ протеина (звана IFN- γ 1 и IFN- γ 2) који изгледа да везују генетички и физички различите IFN- γ R1 ланце. Код свих испитаних тетрапода, постоји један IFN- γ ген који везује јединствен IFN- γ R1 ланац и (код амниота) јединствен IFN- γ R2 ланац. Жабе изгледа да кодирају два различита IFN- γ R2 гене чији се интрацелуларни домени значајно разликују (118).

Различити IFN-и нису подједнако делотворни у односу на сваку од активности IFN-a и показују различиту активност у односу на различите врсте ћелија. Антивирусно дејство IFN- β углавном је локално и спречава репликацију вируса на ограни-

ченом простору, за разлику од IFN- α . IFN- γ има слабије антивирусно дејство, али испољава јаче антитуморске и имуномодулаторне ефекте у односу на IFN- α и IFN- β . IFN- γ интензивира антитуморске ефекте друга два IFN-а. Док IFN- α и IFN- β делују првенствено цитостатски, IFN- γ испољава цитолизну активност (3, 11, 13).

Недавно класификована група интерферона тип III (119) се састоји од три IFN- λ (ламбда) молекула: IFN- $\lambda 1$, IFN- $\lambda 2$ и IFN- $\lambda 3$ (за које се такође користе називи IL29, IL28A и IL28B). Ови интерферонски протеини сигнализирају облик рецепторског комплекса који се састоји од IL10P2 (који је још познат као CRF2-4) и IFNLR1 (CRF2-12).

Прихватање ове класификације је у мањој мери универзално него класификације за тип I и тип II. За разлику од друга два, овај тип тренутно није уврштен у "медицинске предметне одреднице" (119).

Сматра се да IFN-и представљају прву линију одбране организма у вирусним инфекцијама. Антивирусно деловање интерферона може да се одвија директно (ензимима које индукује IFN) и индиректно (преко имуног система) (115). У одбрани организма, IFN-и имају сопствену функционалну организацију и доприносе одбрани и одржавању хомеостазе (5-7, 12-14), а не испољавају деловање у ћелијама у којима се стварају. Прво се морају секретовати, а затим адсорбовати на специфичне рецепторе на мембрани околних ћелија. Почетни молекулски механизми деловања IFN-а на ћелију испољавају се њиховим везивањем за специфичне рецепторе на ћелијској мембрани. Затим активност IFN-а у једру ћелије доводи до успостављања тзв. антивирусног стања, уз испољавање одређених ефеката на саму ћелију. "Антивирусно стање" испољава се на индиректан начин, индукцијом синтезе одређених протеина-ензима који су непосредни ефектори. Када се успостави антивирусно стање, оно траје неколико дана и почиње да слаби. После приближно истог периода настаје могућност поновне индукције оваквог стања под дејством IFN-а. Кинетика продукције IFN-а иста је у току већине вирусних инфекција. Продукција IFN-а почиње 4 сата након вирусне инфекције, достиже максималну концентрацију када синтеза вирусних протеина достигне максимум (6 до 10 часова после индукције), а затим опада. Ниво продукције IFN-а је високо варијабилан (13) и сматра се да је количина створеног IFN-а зависна од концентрације и стабилности mRNK за IFN, док је деловање регулатора транслације од мањег значаја. Обим синтезе

IFN-a редукује се због пораста количине створеног протеина у ћелији, највероватније посредством механизма негативне повратне спреге (13, 21).

Из свега овога се потврђује теза да IFN-и представљају прву линију одбране организма од вирусне инфекције. Код лабораторијских животиња којима су дата антитела специфична за IFN, клиничка слика је била много тежа, а исход вирусне инфекције много неповољнији, у односу на контролну групу. **Најважнији позитиван ефекат IFN-a у току вирусних инфекција представља његова рана појава и деловање у време док су још неактивни специфични механизми имуног система (фактори ћелијског и хуморалног имунитета) (13, 19, 52).**

Интерферони испољавају своје антивирусно дејство везивањем за специфичне рецепторе на ћелијској мембрани. Том приликом долази до фосфорилације тирозина и активације субјединица фактора транскрипције у цитоплазми. Долази до синтезе више ензима који су одговорни за развој "антивирусног стања". У реализацији овог феномена укључена су два ензимска пара:

- **протеин-киназа фосфорилише и инактивира ћелијски фактор иницијације** и тако спречава стварање иницијалног комплекса потребног за синтезу вирусног протеина;
- **олигонуклеотид синтетаза, активира ћелијску ендонуклеазу која деградира m RNK (114).**

Под дејством стимулуса, биолошких и вештачких, долази до **продукције IFN-a**, а **класа и количина продукованог IFN-a варира**, зависно од врсте изворне ћелије и индуктора. **Најважнији индуктор продукције IFN-a је вирусна инфекција**. Уколико се **инфицирају вирусом све ћелије**, у организму долази до **продукције IFN-a типа I** (углавном IFN- α), па чак и **инактивисани вирус може покренути синтезу IFN-a**. Ако дође до **инфекције свим вирусима** (и RNK и DNK вирусима), долази до **индуkcије синтезе IFN-a (13, 52).**

RNK вируси су много **активнији индуктори** у поређењу са DNK вирусима, са изузетком "Роx" вируса. Тиме се објашњава чињеница да су **дволанчане RNK (dsRNK)** из различитих извора саме по себи **моћни индуктори синтезе IFN-a**, па се тако и понашају све природно постојеће дволанчане RNK. Све дволанчане RNK које се природно појављују, укључујући и RNK "Reo" вируса и гљива, индуктори су синтезе IFN-a. Њима можемо придодати и репликативне форме једноланчаних RNK насталих у ћелијама

домаћина. Ово се односи и на синтетске дволанчане полинуклеотиде као што је **"poli I:C"** (поли инозин цитозин) који **индукује IFN-е типа I**. Познат је читав низ индуктора и метаболичких активатора продукције ендогених IFN-а. Ови индуктори испитивани су због истраживања могућности деловања на повећање продукције ендогених IFN-а у ћелијама инфицираним вирусима како би се позитивно утицало на ток вирусне болести (13, 52).

Интерфероне типа I (ту спадају две класе IFN-а: **IFN- α** и **IFN- β**) **природно индукују вирусне инфекције** и ливештачка dsRNK, као што је **"poli I:C"** (10-7). Већину **IFN типа I** одликује **постојаност у киселој средини (pH 2)** и чине их две **серолошки различите класе протеина**. Синтеза IFN-а контролишу три фамилије хуманих гена, које потичу од заједничког претка, а сваки је кодиран посебним геном. Вероватно **све врсте кичмењака стварају IFN- α и IFN- β , а IFN- γ пронађен само код сисара**. Код људи **ген за IFN- α локализован је на хромозому 9**. На споменутом локусу налази се **око 20 блиско смештених неалелских гена**, који по грађи представљају повезане полипептиде средње молекулске масе око 18 kD и међусобно су раздвојени нуклеотидним паровима од неколико килобаза. У структури "генског комплекса" IFN- α нису идентификовани интрони (3-8, 13-7, 19-21). Секвенце разних IFN- α протеина показују око 73% хомологије (5, 13, 21, 56). Поред **класичних, на вредности pH 2 постојаних подврста hIFN- α** , у серуму болесника са аутоимуним болестима и имунодефицијенцијама нађене су и **друге подврсте hIFN- α које се неутралишу anti-IFN- α антителима и непостојане су у киселој средини** (5, 6, 15, 19, 21). **Споменути гени IFN- α могу бити разврстани у две подгрупе ("субфамилије"), означене као IFN- α_1 и IFN- α_2 , односно IFN- Ω** (на основу сродности аминокиселинских секвенци унутар фамилије) (5, 13). **IFN- Ω (IFN-омега) кодира 6 гена, а само један је функционалан и сличан је IFN- γ , а експримиран је на леукоцитима** (13, 21). Већина гена припада "субфамилији" **IFN- α_1** , а њихова карактеристика је да се међусобно минимално разликују, док су **гени IFN- α_2** хетерогенији по структури. Локус IFN- α_2 садржи бројне "псеудогене" и не испољавају исти степен експресије након индукције (3, 13, 21). Ген за IFN- α кодира синтезу полипептида састављеног од 165 или 166 аминокиселина, са молекулском масом од око 18 kD (IFN- α_1), односно 172 аминокиселине, са молекулском масом од 20 kD (IFN- α_2). Структура IFN- α састоји се од четири остатка цистеина који служе за формирање два дисулфидна моста. Полипептидни ланац подлеже процесу N-гликозилацији, по завршеној транслацији, иако је негликолизовани облик биолошки активан (3, 13, 21).

За **IFN- β** постоји само **један ген**. Он је локализован на **кратком краку хромозома 9** и још се није дошло до сазнања да ли постоје и други гени за IFN- β и њихова локација. Постоји могућност да су за продукцију IFN- β одређена неколико гена локализованих на хромозому 2, 5 и 9 (13, 20). Недавно је описан **IFN- β 2** и дат му је назив **интерлеукин-6 (IL-6)** (13, 14).

Гени за **IFN- α** , **IFN- β** и **IFN- Ω** формирају **групу гена на кратком краку хромозома 9**, а свима у структури **недостају интрони**. Гени за **IFN- α** са геном за IFN- β **сачињавају IFN- α /IFN- β суперфамилију гена**. Кодирајуће секвенце IFN- α и IFN- β гена показују око 30% хомологије (5, 13).

За **IFN- γ** постоји **ген локализован на дугом краку хромозома 12** и у својој структури садржи три интрона и четири ексона. Ген за IFN- γ не показује битну хомологију са другим IFN-ским генима, али кодира протеине сличне величине у којима одређене аминокиселине заузимају исте позиције као и у IFN- α и IFN- β (13, 14, 21, 56). **Молекул IFN- γ припада гликопротеинима са молекулском масом од 20 до 25 kD**. Пошто сигналне секвенце нису присутне у секретованим молекулима IFN-а, **стварна величина молекула за IFN- α , IFN- β и IFN- γ износи 143, 145 и 146 аминокиселина** (13, 14, 21, 58).

На основу претходно изложених чињеница, долази се до закључка да **IFN- α продукују поједине врсте леукоцита након стимулације њихове ћелијске мембране вирусима, бактеријама, туморским ћелијама**. Он **редукује дисеминацију инфективних агенаса** (у првом реду, **вируса**) путем крви и **повећава резистенцију леукоцита и ендотелних ћелија против вируса** (3). Постоје и друге породице ИНФ- α -гена у хуманом геному. Поред класичних, на рН 2 постојаних подврста hIFN- α , у серуму болесника са аутоимуним болестима и имунодефицијенцијама нађене су и друге подврсте hIFN- α . Оне се **неутралишу anti-IFN- α антителима и непостојане су у крвотворној средини** (3-8, 13, 21).

У нормалним условима, у људском организму, **концентрација IFN-а је испод детектабилног нивоа**, пошто их ћелије не синтетишу и не садрже IFN као свој конститутивни елемент. Расположиви докази указују да се ово догађа због изостанка транскрипције IFN-ских гена. Међутим, синтеза IFN-а може бити индукована протеинима различитог степена међусобне хомологије (**индусери**) који поседују **својство индукције антивирусног стања**. То су: **вирусна инфекција, dsRNA, бактерије** (односно **бактеријски липосахариди**) и **протозое**. Они се убрајају у "егзогене индусере", за разлику од "физиолошких" или "ендогених" индуктора синтезе IFN-а (различити

метаболички активатори и инхибитори, нпр. **IL-1**) (3, 5, 13, 21-7). Истраживања неопходна за разумевање природе одговарајућих регулаторних секвенци кодираних IFN-ских региона имала су за циљ испитивање деловања различитих "индусера" на активирање транскрипције IFN-ских гена. Првенствено је дошло до истраживања секвенце за ИНФ- β ген и дошло се до сазнања да различите секвенце са различитим специфичностима контролишу експресију α -интерферонских гена и IFN- γ гена. Ова истраживања показала су да је **највише IFN-ских индусера потпало у класу "штетних" стимулуса** јер доводе до синтезе цитотоксичних и инхибиторних протеина (13, 21).

Већина IFN-а се може индуковати вирусима, и то не само вирусима способним за лизу ћелија, већ и инактивисаним вирусима и вирусима неспособним за репликацију (21). **RNK-вируси** су веома **снажни индуктори IFN-ске синтезе** док су **DNK-вируси**, изузимајући "рох" вирусе, **далеко слабији индуктори синтезе IFN-а** (14, 24, 21). У многим вирусним инфекцијама, синтеза IFN-а показује исту кинетику. **Производња IFN-а започиње на око четири сата после инфекције**, достиже **"пик"** (максималну вредност) у тренутку када **синтеза вирусних протеина достиже своју максималну брзину**, а затим **опада**. Основа индукције IFN-а зависи од мултиплициралога вируса и инхибиције синтезе протеина домаћина. **Вирусне инфекције индукују синтезу IFN- α и IFN- β док су гени за IFN- γ знатно мање осетљиви на присуство вируса у ћелијама** (13, 15, 17, 19, 21).

Значајан индуктор IFN-ске синтезе је и **dsRNK**. Све природне **dsRNK** (**dsRNK-е реовируса, фунгални партикули** слични вирусима и **репликативне форме једноланчане dsRNK-е анималних и бактеријских вируса**) **добри су индуктори IFN-а**. То важи и за синтетске дволанчане нуклеотиде као што је **"poli I:C"**. За **dsRNK** доказана је велика способност инхибиције протеинске синтезе у многим ћелијама, као и извесна цитотоксичност. Основа њене индукторске активности у синтези IFN-а највероватније се састоји у инхибицији синтезе лабилног IFN-ског репресора и праћена је везивањем транскрипционих активатора за позитивни регулаторни домен, после чега долази до транскрипције гена за IFN-е (21).

У врло **моћне индукторе синтезе IFN-а** спада и **велики број метаболичких активатора и инхибитора**. Једну класу чине супстанце одговорне за **индукцију синтезе IFN- γ (митогени)** и **лимфокини слични IL-2** за несензитисане лимфоците и специфични антигени за сензитисане лимфоците. У **другу класу** спадају **метаболички активатори** способни за **индукцију синтезе свих класа IFN-а у различитим ћелијама**,

а то су: **тумор промотори** (тј. **"прекурсори"** тумора), тетрадеканол-форбол-ацетат (ТПА), бром-деоксиуридин, дексаметазон и диметил сулфоксид. Све ове супстанце **стимулишу продукцију IFN-а у концентрацији од преко 50 молекула по ћелији**, и то у: **хематопоезним ћелијама, ћелијама лимфома и лимфобластома, леукоцитима и фибробластима**. **Метаболички инхибитори** (инхибитори m RNK-е и инхибитори протеинске синтезе) **индукују синтезу IFN-а**. То значи да се **индукована синтеза IFN-а не одвија по принципу "de novo" протеинске синтезе**. Ова сазнања темељи се на претпоставци да се IFN-ски гени нормално налазе под инхибиторним дејством не-стабилног протеина-репресора, што је и доказано (13, 15, 21).

Поред поменутих **индуктора IFN-ске синтезе** постоје и многобројне друге супстанце са истим дејством (**бактеријски ендотоксин, бактерија "Brucella abortus"** и **"Listeria monocytogenes"**, **"trahoma"** и **агенси коњуكتивитиса, микоплазма, протозоа, рикеције и синтетски полимери и полисахариди**), а заједничка карактеристика свих ових индуктора је да су **цитотоксични и инхибирају протеинску синтезу** (13, 21).

Сви IFN-и испољавају антивирусну активност, модулирају и многе ћелијске функције. Што значи да су **IFN-и имуномодуларни терапијски чиниоци** који поред осталих ефеката, **подижу и цитотоксичну активност лимфоцита *in vitro* и *in vivo* и повећавајући активност моноклеарних макрофага** (1, 3-6, 17-23).

2.4. Молекулски механизми дејства интерферона

Екстацелуларни сигнални протеини за IFN-α (IFN-αs) су у интерреакцији са рецепторима који су испољени на НК-лимфоцитима ("ћелије природне убице" или тзв. "ћелије мете") и преносе сигнале до једра ћелија преко комплексних механизма који су сумирани у активацији протеин киназа, Тук-2 и Јак-1, који испољавају фосфорилацију два протеина молекулске масе од 113 и 91 kD. Ова два активирани протеина формирају заједно и са протеином молекулске масе 48 kD протеински комплекс, назван "интерферон стимулишући генски фактор 3" (ISFG-3) који је транслоциран до једра ћелије, везује се за високо "штедљиви" регион DNK, назван "интерферон стимулишући елемент одговора" (ISRE) и он стимулише транскрипцију интерферон индуцибилних гена. Поставља се питање, ако постоји само један рецептор, зашто постоји више различитих субтипова IFN-α и један IFN-β? Постоји доказ који предлаже интерну хетерогеност IFN-тип I рецептора. Истраживачи предлажу два модела:

1) присутан специфични рецептор сваке субјединице за сваки IFN- α подтип и за IFN- β , и субјединице заједничке за све њих, док они врше њихову активност кроз контакт са специфичном субјединицом;

2) присутан специфични рецептор сваке субјединице за сваки подтип и везивање за појединачни подтип специфичне субјединице и међа друга рецепторска места, спречавајући истовремену везу са другим IFN- α s (14).

Деловање IFN-а почиње везивањем IFN-а за специфичне рецепторе на површини ћелије. Рецептор за IFN налазе се на скоро свим ћелијама, тако да већина њих одговара на деловање IFN-а. IFN-и типа I везују се за исти рецептор сличним афинитетом везивања (афинитет везивања износи 10^{-9} до 10^{-10} мола-М) (13, 84).

IFN- γ испољава биолошке ефекте након везивања за посебан површински рецептор, показујући висок афинитет за свој лиганд (афинитет везивања износи 10^{-9} до 5×10^{-11} М). Број IFN-Rec (рецептора) по једој ћелији износи неколико стотина до неколико хиљада. Комплекси IFN-ћелијски рецептор стварају агрегате на мембрани ћелије и улазе у цитоплазму процесом ендоцитозе (10, 13, 85).

Рецептор за IFN- γ састоји се од две субјединице α и β полипептидног ланца. Ланац α рецептора везује лиганд са високим афинитетом, док ланац β првенствено има улогу у преносу сигнала (13, 87). Сваки од ланаца удружен је са интрацелуларним доменима са специфичном Јанус киназом и то α ланац са Јак1, а β ланац са Јак2. Пренос сигнала почиње интерреакцијом лиганда (**хомодимер IFN- γ**) са два α ланца рецептора који носе Јак1, што води димеризацији α ланца. Следи удруживање два β ланца који носе Јак2 са комплексом IFN- γ - α ланац, што води трансфосфорилацији и узајамној активацији Јак1 и Јак2. Активисане Јанус киназе фосфорилилишу тирозинске резидуе у оба α ланца рецептора и и формирају два везујућа места за CX2 домене латентног цитоплазматског СТАТ1 α . Фосфорилација везаног СТАТ1 α води брзој дисоцијацији комплекса рецептор - СТАТ1 α . CX2 домен једног СТАТ1 α реагује са CX2 доменом другог СТАТ1 α протеина што доводи до формирања СТАТ1 α хомодимера названог **ГАФ ("Gamma Interferon Activating Factor")**. ГАФ се премешта у једро и директно везује за одговарајуће секвенце. Тиме покреће транскрипцију одређених гена који носе одговарајуће ГАС елементе у промоторским регионима. Ниво фосфорилисаног СТАТ1 α достиже максималну концентрацију за време од 15 до 30 минута, а затим опада до минималних вредности у току једног до два сата. Директна активација транскрипције дефинисана је као примарни одговор, јер не захтева синтезу нових транскрипционих факто-

ра. Утврђено је да, поред поред **повећања експресије STAT1 α , IFN- γ повећава и експресију p48 протеина, претретман IFN- γ може повећати одговор на IFN- α ("gamma priming") (13, 90).**

Генетским истраживањима утврђено је да мутантне ћелије којима недостаје STAT1 нису способне да одговоре на IFN- α , IFN- β и IFN- γ , док мутантне ћелије којима недостаје STAT2 и p48 не могу одговарати на IFN- α или IFN- β , али одговарају на IFN- γ . Мутантне ћелије којима недостаје Тук2 не одговарају на IFN- α и IFN- β , док мутантне ћелије којима недостаје Јак2 не одговарају на IFN- γ . Мутантне ћелије којима недостаје Јак1 не одговарају на оба типа IFN-а (5, 13). Има још **празнина у разумевању сигналних путева IFN-а** као што су као што су, на пример, начин на који сличне врсте IFN-а испољавају различите ефекте као и детаљније разумевање начина везивања IFN-а за рецепторе и интерреакције које доводе до активације тирозин киназа након везивања за рецептор (13, 86).

Деценијама је постојала недомица у изучавању IFN-а, и то како везивање ових протеина омогућава ћелији да савлада вирусе и да IFN-и изврше остале биолошке функције. Дуго је познато да **IFN-и** као и други **сигнални протеини**, преносећи сигнале са ћелије на ћелију, испољавају ефекте активацијом сигналних трансдукционих путева. **Сигнални трансдукциони пут састоји се од каскадних реакција и почиње када се сигнални молекул веже за рецептор на ћелијској мембрани.** Овај процес узрокује да део рецептора који лежи унутар ћелије преноси сигнале на друге молекуле у ћелији. Везивање ових молекула за њихове рецепторе води повећању нивоа интрацелуларних супстанција – названих **секундарни месенџери** који мигрирају кроз цитоплазму (везивање молекула за рецепторе често се врши заобилазним путем). Повећани нивои ових супстанција могу покренути дугу **каскаду ензимских и других молекулских интерреакција.** Овим процесом сигнални молекули **активирају ћелију,** делујући преко низа интрацелуларних посредника (13, 86).

Сигнални трансдукциони путеви покренути IFN-има не зависе од **секундарних преносника.** После везивања IFN-а за мембранске рецепторе, долази до **гомилања комплекса IFN-рецептор** у мембранским инвагинацијама и његове **интернализације,** односно долази до **уношења IFN-а у ћелију** путем **ендоцитозе посредоване рецептором.** Тада долази до разградње IFN-а у лизозомима. Везивањем IFN-а, **рецептор се интернализује и бива инактивисан.** Услед дејства IFN-а долази до **смањења броја површинских рецептора за IFN на ћелијама.** Зато су **рецептори за IFN регулисани негативном интерреакцијом са лигандом,** а негативна регулација IFN-ских рецепто-

ра доводи до губитка 50 - 80% истих. Преостали рецептори, могу одговорити на даљу стимулацију IFN-ом (13, 19). После интернализације IFN-а (тј. ендцитозом посредоване IFN-ским рецептором), долази до **трансдукције сигнала од мембране до једра ћелије**. Биохемијске секвенце тих каскадних реакција дуго су биле непознате (10, 13).

Изучавања сигналних трансдукционих механизма IFN-а довела су до открића две класе протеина и дефинисања путева "**Jak/STAT**" ("*Janus family Kinases and Signal Transducer and Activator of Transcription Proteins*"), који су укључени у **сигналне путеве индуковане многим цитокинима** (13, 87). После **активације рецептора за: IFN- α , IFN- β и IFN- γ , "ГМ-ЦСФ "** (фактор раста грануло-моноцитопоезе), "**Г-ЦСФ**" (фактор раста гранулоцитопоезе); **IL-2; IL-3; IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-10; IL-12; IL-13 и IL-14** јављају се **интрацелуларни сигнали преко "Јак/ СТАТ" система** (13, 88).

Подгрупа "**protein tyrosin kinases**" ("**ПТК**") представља групу ензима и ново-идентификовану класу ензима – "**Janus фамилија киназа**". "**ПТК**" су **ензими који катализују фосфорилацију тирозинских резидуа у протеинима**. Протеинске интеракције и деловање ензима регулишу се фосфорилацијом тирозинских резидуа. Што значи да су киназе есенцијалне компоненете које имају кључну улогу у многим интрацелуларним каскадама у лимфоцитима и другим типовима ћелија. "**ПТК**" **посредује и у преносу терминалних фосфата, аденозин три фосфата (АТФ-а) до хидроксилних група тирозинских резидуа протеина. Ограничен сет супстрата фосфорилише се посебном врстом "ПТК"**. Та специфичност одређена је аминокиселинским секвенцама у околини тирозина, као и терцијарним структурним карактеристикама супстрата, односно протеина. "**Janus киназе**" је група **нерецепторских протеинских киназа** (за разлику од "src" и "src-ZAP-70"); чланови ове групе ензима носе два места потенцијално способна да додају фосфатне групе протеинима. Ови ензими садрже консензус регион који деле са серин/треонин протеинским киназама, уз поседовање консензус региона који делује са другим протеинтирозин киназама. "Janus киназе" су дволанчане услед поседовања два консензус региона, а други наведени регион није функционалан, тако да је испољена само једна активност, и то фосфорилација тирозинских резидуа протеина (5, 13). До сада је дефинисано **више изоформних облика "Јак-киназе"** (1, 2, 3, Тук-2), а у сигналне трансдукционе путеве покренуте IFN-има укључене су **три структурно сродне цитоплазматске "ПТК" и то: "JAK1", "JAK2" и "Тук2"** (13, 88).

"**СТАТ протеини**" су фамилија протеина која се састоји од 7 различитих генских продуката. Чланови ове фамилије су: "**STAT1", "STAT2", "STAT3", "STAT4",**

"STAT5a", "STAT5b" и "STAT6" и имају кључне посредничке улоге у испољавању биолошких дејстава различитих цитокина и фактора раста. Изучавања сигналних трансдукционих путева IFN-а довела су до открића **фамилије гена** названих **"ИСГс"** (*"Interferon-Stimulated Genes"*). Транскрипција ових гена директно и веома брзо (у току 15 до 30 минута) активише се у ћелијама, које су третиране IFN-ом, и није зависна од синтезе новог протеина. Анализама промоторских региона ових гена откривено је присуство две класе конзервисаних нуклеотидних секвенци, које управљају брзом активацијом индукованих гена. Први елемент назван **"ИСРЕ"** (*"Interferon Stimulated Response Element"*) одговоран је за **експресију IFN- α/β гена**, а други елемент назван **"ГАС"** (*"Gamma Interferon Activating Sequence"*) делује на **активацију IFN-гама индукованих гена** (13, 87). **"ИСРЕ"** може везати трансдукциони фактор **"ИСГФ-3"** (*"Infection Stimulatory Gene factor 3"*) који је присутан у једру ћелије на које је деловао IFN- α или IFN- β , али није присутан у једру неутралних ћелија. **"ИСГФ-3"** састоји се од **3 протеина** (5, 13):

- 1) **"STAT1"** – може бити синтетисан као изоформа од 91 kD названа као **"STAT 1 α "** или као изоформа од 89 kD названа **STAT1 β** ;
- 2) **"STAT2"** – полипептид од 113 kD;
- 3) **"п48"** – полипепти од 48 kD.

Транскрипциони фактори "STAT1 α " и "STAT2" необични су јер садрже фосфотирозин везујуће домене. Важност **"СХ2" домена** утврђена је кад је установљен механизам IFN-ом индуковане активације **"СТАТ" протеина**. У нестимулисаним ћелијама, **"СТАТ"** протеини присутни су у цитоплазми у латералној мономерној форми. Додавањем IFN-а ћелијама, **"СТАТ"** протеини се активирају тирозин фосфорилацијом и формирају хомодимере или хетеродимере, премештају се у једру и везују за промоторске **регионе "ИСГ"**, што има за **последницу индукцију гена** (13, 87).

До **активације ензима тирозин киназе 2 ("Тук2")** долази **везивањем IFN- α или IFN- β за рецептор**. Ензими **"Тук2"** највероватније су припојени за интрацелуларни домен рецептора. **Везивање IFN-типа I за рецептор** доводи до **активације "ЈАК1"** (13, 85). Када **везивањем IFN- α или IFN- β дође до груписања IFN-ских рецептора, специфичне киназе "Тук2" и "ЈАК1"**, међусобно се активирају и додатно фосфорилишу специфичне тирозинске резиде **локализоване у интрацелуларним регионима груписаних рецептора**. Специфичност везивања **"ЈАК" киназе и "СТАТ" протеина** одређена је аминокиселинским резидуама у непосредном суседству фосфори-

лисаних тирозинских резидуа, тј. **рецепторске секвенце обезбеђују места везивања ("docking sites")**. Они детерминишу везивање протеина са "CX2" доменима. "СТАТ" протеини после фосфорилације, одвајају се од рецептора и димеризују. То омогућава новим "СТАТ" протеинима да се вежу за рецептор. Домен "SX2" везује фосфотирозинске резиде у "СТАТ2" и обрнуто и тако долази до формирања активисаних, тј. фосфорилисаних хетеродимерних форми ових протеина. Протеин "п48" везује се за "СТАТ1"/"СТАТ2" хетеродимере и долази до формирања **активног комплекса транскрипционог фактора "ИСГФ-3"**. "ИСГФ-3" премешта се у једро и препознаје "ISRE" мотив унутар промоторских региона одговарајућих гена, и покреће транскрипцију. **Индуковањем експресије гена који садрже "ISRE" секвенце** и овај хетеродимерни комплекс делује као **транскрипциони фактор**. Није потребна синтеза новог протеина да би дошло до директне активације транскрипције специфичног сета гена (5, 13, 87, 89).

IFN-αs су високо активни молекули који захтевају делимично ангажовање ћелијских рецептора комплетан биолошки одговор. Треба такође предузети на рачун којег је број IFN-рецептора по ћелији варира према "ћелијама мета": постоје око 3.300 везујућих места по ћелији за AU 937 хумане моноцитоеидне ћелије, више од 2.550 везујућих места по ћелији за MBDK говеђеих ћелија и око 12.700 места за **"Daudi" лимфобластоидне ћелије**. Разлике у аминокиселинским секвенцама и у структури између IFN-α и IFN-β такође обезбеђује специфична физичкохемијска својства која разликују типове I IFN-αs. Експериментални налаз *in vivo* са IFN-α и IFN-β инјекцијом у једнаким количинама има различиту фармакокинетику. Значајно је открити у којим концентрацијама IFN-α може бити детектован у доза-зависним количинама у плазми, док ово никад није случај са IFN-β. Трансдукциони сигнал наводи да **IFN доводи до комплексне биолошке активности** која је конвенционално подељена у три типа активности IFN-а: **антивирусна, антипролиферативна и имуностимулативном** (14).

2.5. Клонирање IFN-ских гена у експресионим векторима

Због немогућности да се обезбеде довољне количине hIFN-а за задовољење светских потреба за клиничке и експерименталне потребе, седамдесетих година двадесетог века, многе лабораторије су радиле методологијом генетског инжињеринга на "масовној" производњи рекомбинантног IFN-а (rIFN-а). Ово је пошло за руком

Taniguchi-у и сарадницима 1979. године (13, 17). Они су произвели rIFN-а генетским инжињерингом и доказали да хумани геном садржи бројне IFN- α гене и псеудогене, ИНФ- β ген и IFN- γ ген. Ови гени били су поређани по одређеном редоследу, додељена им је специфична хромозомска локација у хуманом геному, и уметнути су у прокариотичне и еукариотичне експресионе векторе. Зато IFN-и данас могу бити произведени у великим количинама у бактеријама, квасцу и ћелијама сисара. Генетски инжињеринг обезбедио је добијање хибридних IFN-ских gena који имају специфичну примену у клиничкој пракси. Једна од предности rIFN-а над досадашњим биотехнолошким процедурама је да се редукује ризик контаминације препарата rIFN-а вирусима. Технологијом генетског инжињеринга добијен је rIFN- α , "исечањем" хумане DNK секвенце специфичне за одређени подтип IFN- α и "убацивањем" у колонију бактерија "*Escherichia coli*" у којој је дошло до синтезе rIFN- α , одакле је касније екстрахован (17, 21).

У седмој деценији двадесетог века, користећи савремене технологије генетског инжињеринга, велике фармацеутске компаније су радиле на добијању рекомбинантних интерферона. Тако је "Roche" произвео "*Roferon*" користећи *интерферон- $\alpha 2a$ ген* као преносни вектор, а компанија "Schering" произвела је "*Intron*" тако што је користила *интерферон- $\alpha 2b$* . Молекули ова два препарата rIFN-а разликују се само у једном аминокиселинском остатку лизина на позицији 23 код "*Roferon*"-а коме је замењено место са аргинином у "*Intron*"-у. Рекомбинантни интерферони се разликују од природних хуманих интерферона тиме што неки молекули рекомбинантних интерферона који се екстрахују из бактеријских колонија не морају да имају терцијарну структуру као хумани интерферони који су продуковани из хуманих ћелија. Овом чињеницом се може објаснити развој антитела на рекомбинантни интерферон код пацијената на хроничном програму са rIFN-ом (17).

Методe генетског инжињеринга такође биле су искоришћене да се направе рекомбинантни интерферон- β и рекомбинантни интерферон- γ . Као што се rIFN- α разликују у терцијарним структурама од природних hIFN- α , тако су и rIFN- β и rIFN- γ направљени експресијом одговарајућих gena у колонији бактерија "*Escherichia coli*" без гликозилације. Изгледа да ова разлика у терцијарној структури rIFN-а не утче на њихову биолошку активност кад су тестирани *in vitro*, али може изменити њихову структуру и антигеничност и може утицати на њихову дистрибуцију у људском организму (17).

Клонирање IFN-ских гена може да се изводи не само у бактеријама, већ и у квасцима, инсектима и сисарским експресионим векторима. Тако је успела производња rIFN- γ великим количинама од 4×10^9 IU/l (15% од укупног ћелијског протеина) у "*Escherichia coli*" под контролом јаког "T5" раног прекурсора и снажног везујућег места на рибозому. Овде нема гликозилације, али је rIFN- γ биолошки активан. Коришћен је и квасац као експресиони вектор и IFN-ски гени су клонирани у "*Escherichia coli*", уз употребу 3-фосфоглицерат киназе или "*alc DI*" ген прекурсора. Том приликом добијен је принос већи од 10^8 IU/l од биолошке активности hIFN- α . Исто тако високи приноси hIFN- α могући су у ћелијама сисара уз употребу експресионог вектора који је сличан као "*dhfr-CB 40 вектор*" (26, 32). У производњи hIFN- α даје се преимућство овим експресионим системима који продукују hIFN као конститутивни елемент. Продукција hIFN- α помоћу експресионих система, данас се користе широко у клиничким студијама (13, 21, 79, 80).

Према вероватном саставу хибридних гена, помоћу рекомбинантних DNK технологија урађено је доступно клонирање IFN-ских гена. Чињеница да различити IFN-ски гени показују висок степен промена у њиховим биолошким својствима указује на значај ових претпоставки. На пример, сви "hIFN- $\alpha 1$ " поседују сличне антивирусне активности на говеђим ћелијама, али њихова активност се мења на хуманим ћелијама. У току испитивања дошло се до сазнања да две хумане "IFN- $\alpha 1$ " специфичности "IFN- $\alpha 1D$ " и "IFN- $\alpha 1I$ ", поседују високу активност у ћелијама мишева. Ове чињенице дају предност клонирању хибридних IFN-ских гена и олакшавају идентификацију региона одговорног за биолошку активност IFN- α . То омогућава клонирање нових хибридних IFN-ских гена уз повећање активности у одређеним ситуацијама и у специфичним ћелијама или органима. Данас је испитана и доступна грађа бројних хибридних IFN- α , као и специфичност стварања у ћелијама домаћина (13, 21, 79-82). На основу досадашњих сазнања дошло се до открића да је фамилија и "природних" IFN- α и "генетски" клонираних IFN- α јако разноврсна и комплексна. У оквиру стандардизације IFN- α "Светска здравствена организација" (СЗО) је дала номенклатуру IFN- α која је приказана у табели 3 (83).

**Табела 3. Номенклатура IFN-a
према стандардизацији "World Health Organization" (WHO) (83)**

НОМЕНКЛАТУРА ИНТЕРФЕРОНА			
1) Главна класа интерферона			
Интерферон алфа (IFN-α)			
Интерферон бета (IFN-β)			
Интерферон гама (IFN-γ)			
2) Природни интерферони			
Класа	Ткивни извор	Назив	"Заштићени" назив произвођача
IFN-a			
IFN- α	Хумани леукоцитни buffy coat	hIFN- α (Jle)	
	"Namalva" лимфобластоидна ћелијска линија	IFN- α -H1	Wellferon: Burroughs Wellcome
IFN- β	Хумани фетални фибробласти коже	hIFN- β	
IFN- γ	Активирани Т лимфоцити	hIFN- γ	
3) Генетски клонирани интерферони			
Класа	Ранији назив	Нови назив	Заштићени назив произвођача
IFN-a			
IFN- α	rIFN- α -A	IFN-алфа-2a	Roferon: F. Hoffmann-La Roche and Co. Ltd.
	rIFN-a- α -2	IFN-алфа-2b	Интрон: Schering Corp. Boehringer Ingelheim Ltd.
	rIFN-a- α -2(арг)	IFN-алфа-2c	
	алфа-1	rIFN- α 1	
	алфа-Д	rIFN- α D	
IFN- β		rIFN- β	
IFN- γ		rIFN-a- γ	Immuneron: Biogen

2.6. Дефиниција активности IFN-a

IFN је једна од, до сада, најпотентнијих биолошких супстанци. Његова активност се изражава у интернационалним јединицама (IU) при чему се једна IU дефинише као количина IFN-a која ће смањити активност вируса за 50%. У пракси се најчешће, за одређивање антивирусне активности у култури ткива, користи метод инхибиције цитопатогеног ефекта, који одређује *једну интернационалну јединицу (IU) као смањење цитопатогеног ефекта за 50%* (21, 48, 83).

2.7. Биолошки ефекти IFN-a

Након открића IFN-a, дошло се до сазнања да је он **посебан протеин продукован у домаћину након вирусне "инвазије"** и тада се сматрало да је **антивирусну активност једина биолошка активност коју IFN поседује**. Још 1957. године Isaacs и Lindenmann су доказали присуство протеинског фактора са антивирусним дејством назвали га **интерферон (IFN)** и дефинисали као **"солубилни фактор пилеће хорион-алантоичне мембране, која је била изложена инактивисаном вирусу инфлуенце"** (13, 15-21, 46-8, 53-9). Када су IFN пренели у свежа ткива, констатовали су да се његова антивирусна активност испољава због инхибиције репликације вируса. Још тада се претпоставило да IFN, чија је **ендогена продукција већа после деловању специфичних стимулатора, главни посредник природне отпорности организма** (1, 3, 10, 18, 55).

Систем деловања IFN-a веома је **комплексан** и на основу досадашњих сазнања дошло се до закључка да у фамилији интерферона постоји **много протеина са IFN-ском активношћу** и да су **биолошка дејства IFN-a многострука** (21).

Данас су познате многе друге **биолошки активности IFN-a**, поред **антивирусног, односно антирепликацијског**. Међу најзначајније биолошке ефекте IFN-a, у литератури се наводе (13,14, 21):

- 1) **антипролиферативни ефекат на нормалне или туморске ћелије** (инхибицијом експресије одговарајућих прото онкогена);
- 2) **имуномодулаторни ефекти** се испољава активација макрофага, инхибиција миграције моноцита, модулацијом (стимулација или инхибиција) ћелијских и/или хуморалних ефекторних имуних функција и стимулацијом NK ћелија ("ћелија природних убица");

- 3) интензивирање експресије неких ћелијских антигена;
- 4) индукција синтезе дисталних цитокина;
- 5) регулација диферентовања фибробласта, адипоцита и неких врста леукемијских ћелија;
- 6) општи антиинфламацијски ефекти (заштита од интрацелуларних или екстрацелуларних микроорганизама тј. бактерија, рикеција, паразита и др.) и
- 7) ауторегулаторни ефекат (може инхибирати пролиферацију саме изворне ћелије) (1, 4, 6, 8, 13, 15, 19-21, 53, 91-6).

Комплексне биолошке функције IFN остварује тако што индукује стварање бројних протеина и многи од њих учествују у имунорегулацији или одбрани од вирусне инфекције (20). Промене ћелијске функцији које су индуковане IFN-ом су (20):

- а) повећање цитотоксичности макрофага, неутрофила, NK ћелија и Т-лимфоцита;
- б) повољни ефекти на сазревање Б-лимфоцита;
- в) повећана инхибиција диференцијације вируса;
- г) заштита ћелија од вирусне инфекције и других интрацелуларних паразита.

Ћелија у интерреакцији са индукованим протеинима може одговарати промењеном пролиферацијом, продукцијом нових ензима, мењањем свог цитоскелета или модификовањем своје ћелијске површине. Тада долази до функционалне манифестације ових промена у организму домаћина, као што су: успостављање и развој антивирусног стања, модификација имуног одговора или различите појаве сличне оним које су индуковане хормонима (21).

На основу досадашњих открића може се доћи до закључка да су **основне биолошке функције IFN-а типа I** су (13,14, 21, 52):

- 1) инхибиција вирусне инфекције;
- 2) повећање цитолитичког дејства NK ћелија;
- 3) изузетно снажна индукција експресије молекула система HLA класе I и инхибиција молекула система HLA класе II;
- 4) инхибиција ћелијске пролиферација;
- 5) активирање индукције Т-лимфоцита (овај ефекат је најизраженији код CD8⁺ лимфоцита, тј. "лимфоцита меморије" који памте страни антиген при првом сусрету и имају веома важну улогу у покретању секундарног имуног

одговора). Овај ефекат активирања индукције Т-лимфоцита независтан је од присуства антигена и без обзира што се дешава само један циклус, поликлонска природа таквог одговора доводи до значајне укупне експанзије CD8+ лимфоцита (13, 17, 21).

Прве три набројане биолошке функције синергистички делују на спречавање вирусне инфекције. Паракрином акцијом IFN-а типа I дају ћелијама способност спречавање репликације вируса, повећавају уништавање ћелија заражених вирусом (дејством NK ћелија) и олакшавају презентацију вирусних пептида преко експримираних молекула HLA класе I. Антипролиферативна функција IFN-а типа I користе се у терапији малигнома (52).

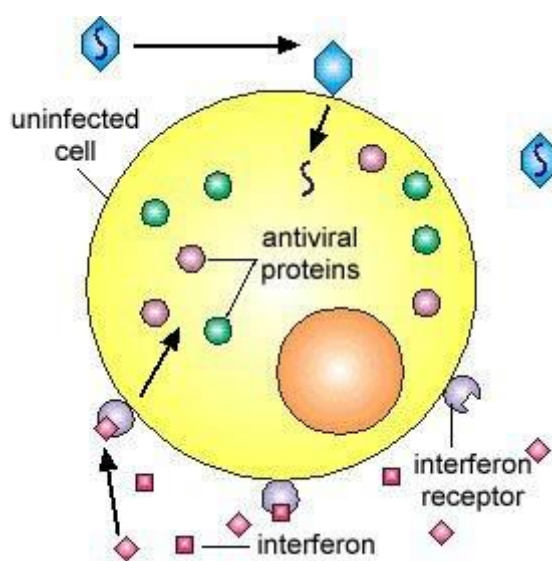
Као што је већ речено, у IFN-а типа II спада само IFN- γ . Биолошке функције IFN- γ су (52, 125):

- Индукција експресије HLA молекуле класе I на свим соматским ћелијама;
- Индукција експресије HLA молекула класе II на АПЋ ("антиген презентујућим ћелијама" и соматским ћелијама);
- Активација макрофага, неутрофила и NK ћелије;
- Промоција ћелијског имунитета (инхибиција Th2 ћелија).
- Антивирусни ефекти.

2.8. Антивирусна активност IFN-а

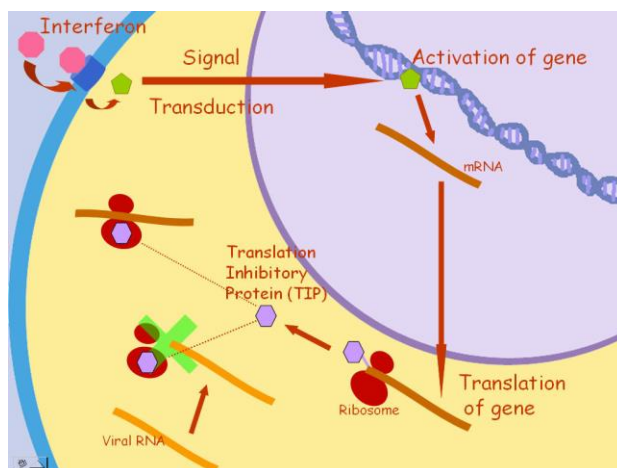
Након открића IFN-а, као **вирусом индуковани фактор одговоран за успостављање резистенције на вирусну инфекцију**, сматрало се да је то и једина функција IFN-а. Тај **концепт је ревидиран** када су откривене и биолошке функције IFN-а. Без обзира на откриће великог спектра биолошких функција IFN-а, јер је **он снажан регулатор многих процеса у ћелији**, **антивирусни ефекат IFN-а је остао у фокус интересовања** многих вирусолога (1, 3, 13, 15, 16, 19-21, 47, 56-8). На почетку се сматрало да IFN-и представљају прву линију одбране организма од инфекције. Доказано је да вирусне инфекције проузрокују појаву различитих вирусних болести код експерименталних животиња третираних антителима усмерним против IFN-а у односу на животиње са нормалном продукцијом IFN-а. Ипак постоји сумња да су различите форме IFN-а прва линија одбране организма против вирусних инфекција. При појави вирусне инфекције у организму, IFN је у потпуности мобилисан, пре имуног механизма (21).

Вирусни репликациони циклус пролази кроз низ етапа, тако што **почиње иницијалним контактом са циљном ћелијом** и завршава се **ослобађањем зрихлих вирусна**. Деловање IFN-а могуће је у различитим фазама вирусне репликације, почев од пенетрације, стицање овојнице вируса, транскрипције, транслације и стварања вирусног потомка (вируса). Често се дешава да IFN делује на више фаза истовремено. У условима природног појављивања, IFN штити многе ћелије од цитопатогеног ефекта вирусне инфекције, али не доводи до комплетне елиминације вируса (13). Антивирусна активност шематски је приказана у слици 2 (116).



Слика 2. Антивитусна активност интерферона (116)

Инхибиција вирусне репликације индукована IFN-ом укључује **интерференцију са способношћу транслације родитељске или ране вирусне mRNK**. Као резултат тога долази до **немогућности синтезе специфичних вирусних протеина** и постојања вирусног генома, односно долази до **савладавања вирусне инфекције**. IFN-и не инхибирају директно вирусну репликацију, већ делују индиректно индукујући синтезу ћелијских протеина одговорних за биолошка дејства IFN-а (13). Инхибиција вирусне репликације изазвана IFN-ом може се шематски приказати (слика 3).

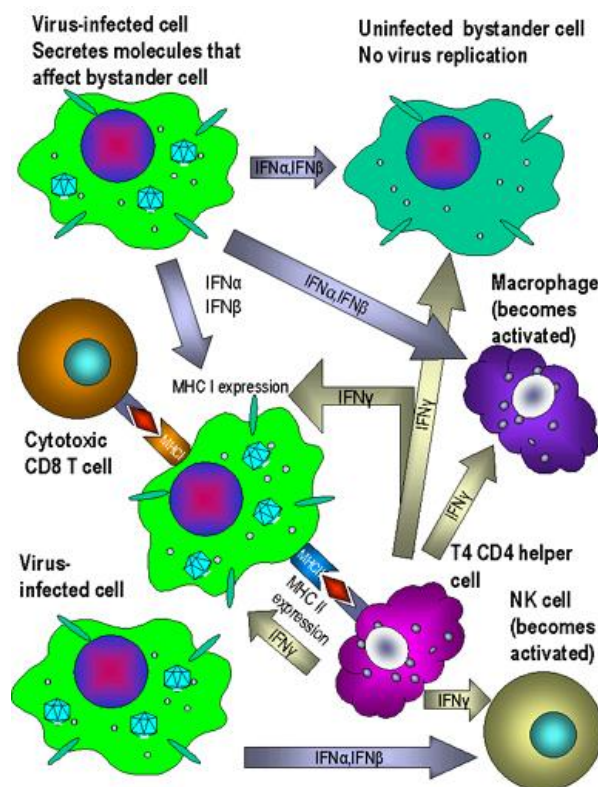


Слика 3. Инхибиција вирусне репликације изавана интерфероном (116)

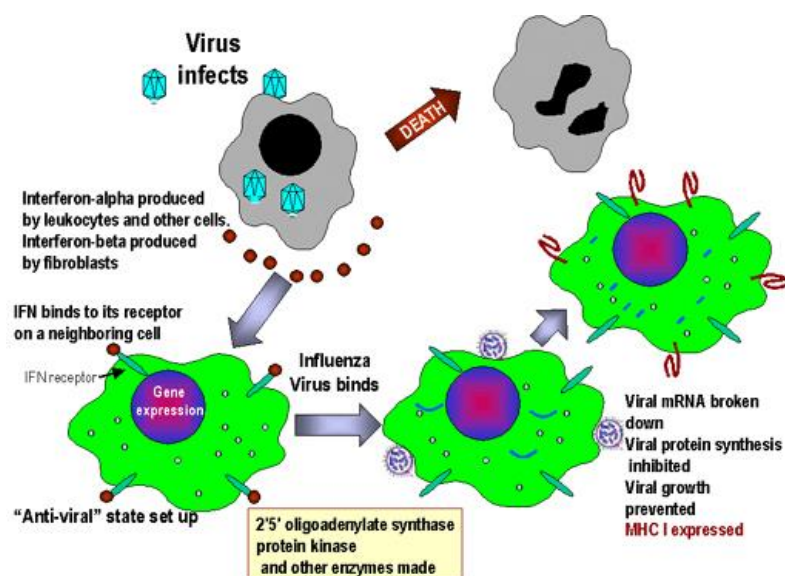
Стицање резистенције на вирусне инфекције са широким дијапазоном вируса настаје као резултат промене метаболизма IFN-ом третираних ћелија. IFN је веома потентан као антивирусни агенс. То се огледа у чињеници да веома мале количине IFN-а од три пикограма могу да заштите око један милион ћелија од дејства десет милиона вирусних партикула. Ово значи да IFN може деловати на веома малом молекуларном нивоу и то на фентомоларним (10^{-15} мола) нивоима (20). И поред тога што је осетљивост вируса варијабилан параметар (зависи од типа ћелија домаћина, инфективне дозе вируса и типа IFN-а који се користи), доказано је да нешто више од 50 молекула IFN-а по ћелији успоставља антивирусно стање (21).

И поред широког дијапазона открића антивирусног дејства IFN-а, механизми деловања IFN-а против великог броја вируса остају и даље непотпуно разјашњени. Неки вируси (нпр., многи DNK вируси) релативно су отпорни на деловање IFN-а. Начин антивирусног дејства IFN-а најбоље је проучен у случају "picorna" и "influenza" вируса. Три најбоље проучена ензимска пута одговорна за испољавање антивирусног дејства IFN-а су: P1/eLF-2 протеин киназа, 2'5' олигоаденилат синтетаза и Mx протеин (13).

Са доста потешкоћа дошло се до дефинисања механизма помоћу којег IFN инхибише пролиферацију вируса (21). Тек се уочавањем разлике између тока вирусне инфекције у IFN-ом заштићеним и IFN-ом незаштићеним ћелијама (што је приказано у шемама 1 и 2), стиче права слика о антивирусном дејству IFN-а на макроскопском нивоу која је употпуњена молекуларним механизмом антивирусног дејства IFN-а.



Шема 1. Деловање вируса на ћелију заштићену IFN-ом (116)



Шема 2. Деловање вируса на ћелију незаштићену IFN-ом (116)

Синтезе IFN-а у ћелији дешава се у присуству индуктора синтезе IFN-а. Након синтезе молекула IFN-а, он напушта ћелију и доспева у међућелијски простор. Ту остварује контакт са другим ћелијама и спреман је да помогне другим ћелијама да се заштите од вирусне инфекције и произведу анти вирусно стање ћелије. Најчешће IFN-и стижу до ћелија пре вируса, реагује са IFN-ским рецептором на ћелијској мембрани, изазивајући експресију одређених гена и проузрокује интерцелуларну синтезу антивирусних протеина (2'5' олиго аденилата и протеин киназе молекулске масе од 67 kD). Антивирусни протеини спречавају размножавање вируса на нивоу синтезе вирусних протеина иако је вирус продро у ћелију (1, 13, 19-21). Степен заштите коју IFN пружа ћелијама зависи од концентрације IFN-а и мултиплицитета вирусне инфекције. Високе дозе IFN-а штите од инфекције ниског мултиплицитета, док инфекција високог мултиплицитета поништавају заштитне ефекте IFN-а (21).

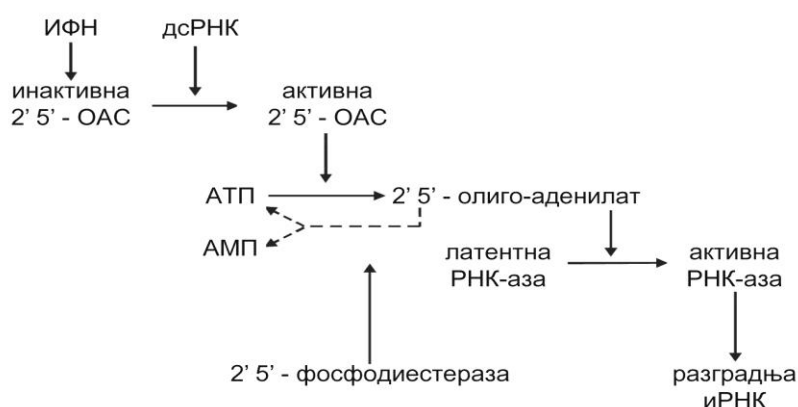
Интерференција са способношћу транслације родитељске или ране вирусне mRNA укључује инхибицију вируса индуковану IFN-ом. Немогућност синтезе специфичних вирусних протеина и спречавање стварања потомства вирусног генома настају као резултат *инхибиције вирусне репликације*, односно савладавају вирусну инфекцију под утицајем IFN-а. IFN-и не делују директно на инхибицију вирусне репликације, већ делују индиректно, индукујући синтезу ћелијских протеина одговорних за биолошка дејства IFN-а (21).

Антивирусни механизми против различитих вируса који су индуковани деловањем IFN-а, разликују се међусобно. У стањима инхибиције вирусне репликације који су постигнути третманом ћелија са IFN-ом, знатно се **снижава број ослобођених вирусних партикула**, тако да се новонасталим вирусима **смањује специфична активност**. **Повећање броја вирусних партикула** које и даље остају у вези са плазматским делом мембране ћелија у неком интермедијалном стању које учествују у процесу здруживања, настаје као последица **смањења броја вируса ослобођених из ћелија**. У свим антивирусним механизмима синтетишу се нормалне количине вирусних протеина RNK-е, али синтетисани протеини су у многим системима дефектни и у томе учествује латентна RNK-аза (LRNK) (13, 17, 21).

P1/eIF-2 протеин киназа по хемијском саставу је серин-треонин киназа са две изражене активности киназе, од којих је једна усмерена на **аутофосфорилацију**, а друга на **фосфорилацију супстрата**. Процес **фосфорилације-дефосфорилације** важан је ме-

ханизам којим се контролише активност вирусних протеина, а тиме и других вирусних биолошких процеса, укључујући и регулацију вирусне репликације. Протеин киназа фосфорилише неколико ензима у инфицираним ћелијама, посебно се ради о протеинима који су означени као $p67kD$ или $p72kD$ и малу α -субјединицу фактор $eIF-2$ (фактор иницијације синтезе протеина). Последице фосфорилације $p67kD$ ($p72kD$) протеина за сада су непознате, док је фосфорилација мале субјединице $eIF-2$ позната. Ензим се активира везивањем дволанчаних RNA структура. Обе групе вируса (RNA и DNA), стварају RNA интермедијере који могу активирати протеин киназу. Под утицајем IFN -а ниво протеин киназе повећан је за више од двадесет пута у инфицираним ћелијама третираним интерфероном у односу на релативно низак ниво ензима у ћелијама које нису индуковане IFN -ом (13).

Разлог због кога у неким инфицираним ћелијама нема активације латентне RNA -азе ($LRNA$), она се као супстрат везује и једино бива активирана $2'5'$ ОАС-ом. Изостанак инхибиције вирусне репликације нефосфорилисаног петог терминалног краја $2'5'$ ОАС-а (21). Механизам антивирусног деловања $2'5'$ Олиго Аденилат (ОА) система може се шематски приказати (шема 3)

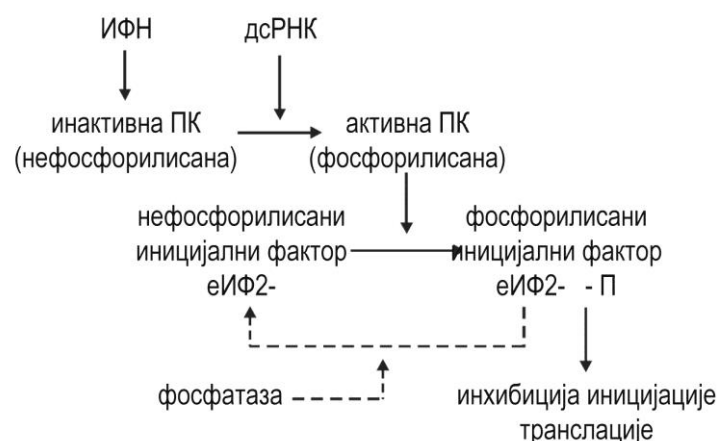


Шема 3. Механизам антивирусног деловања $2'5'$ Олиго Аденилат (ОА) система (директни механизми антивирусног деловања)

Директно инхибирање синтезе протеина одговорно је за остваривање анти-вирусног стања под утицајем IFN -а. Остваривање антивирусног стања под утицајем IFN -а врши се путем $2'5'$ ОА-система и ензимског система. Тај ензимски систем је $dsRNA$ -зависан-протеин-киназа систем чији је кључни ензим протеин-киназа (ПК). Зависно од типа хуманим ћелија које су третиране IFN -ом, ниво ПК обично расте, по једним ауторима (94) пет до десет пута, а по другима (21) чак и до двадесет пута. Испитивања су показала да у "HELLA" и "Daudi" ћелијама, ПК се може

индуковати са мање од једне јединице hIFN-а. Утврђено је да се максимална синтеза ПК одвија шест до девет сати након дејства IFN-а. Хумана ПК је протеин молекулске масе од 67 до 72 kD, чија је m RNK-а дуга 2,5 килобаза (kb). Из изложеног дејства ПК система може се уочити двострука функција ПК у успостављању антивирусног стања у ћелији. Једна функција је аутофосфорилација, а друга фосфорилација α субјединице иницијалног фактора eIF-2 протеинске синтезе. За процес фосфорилације неопходно је присуство dsPNK-е, АТП-а и магнезијумових (Mg^{2+}) јона, а за његово одвијање није потребно присуство цикличног-аденозин-моно-фосфата (цАМП-а) и цикличног-гуанин-моно-фосфата (цГМП-а). На основу испитивања процеса фосфприлације претпостављено је да ПК у свом активном центру има неколико места за везивање фосфата (94).

Антивирусни механизми у ћелијама које су индуковане IFN-ом инхибирају синтезу вирусних протеина на два начина, и то: директно, фосфорилишући eIF-2 фактор протеинске синтезе (то чини и ПК); или индиректно разграђујући mRNK за вирусне протеине (то чини 2'5' ОА-систем). Због онемогућене протеинске синтезе у ћелији у којој се налази вирус, долази до недостатка свих вирусних протеина, па и конститутивних протеина омотача вируса. У овим ћелијама неће се стварати нови вируси чак и ако постоји нормална репликација вирусног генома, услед недостатка протеина вирусног омотача. Овим се постиже да се вирусна инфекција не може даље развијати и да је вирусна инфекција стопирана. Инхибиција репликације вируса у ћелијама индукованих IFN-ом означени су као антивирусни механизми (13, 14, 17, 21). Директни механизам антивирусног деловања IFN-а преко ПК система је приказан у шеми 3, а индиректни механизам антивирусног деловања на протеинску синтезу је дат у шеми 4.



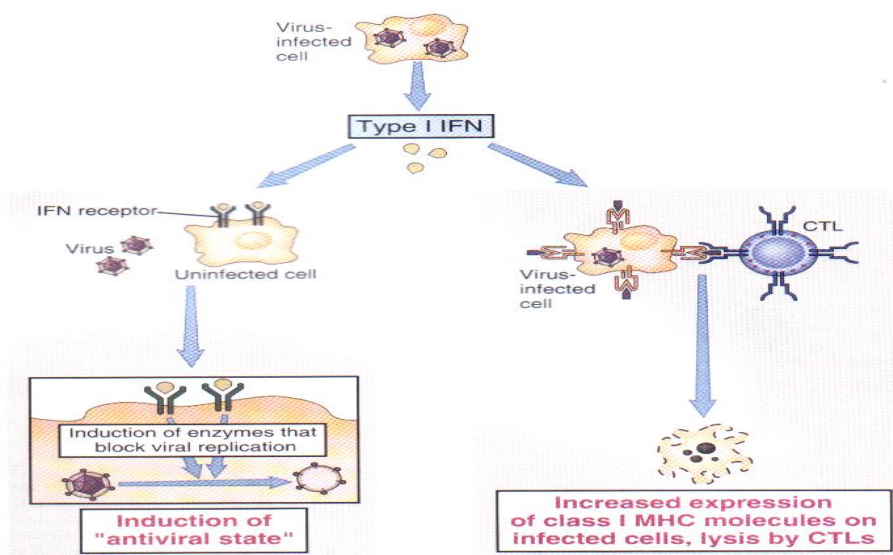
**Шема 4. Механизам антивирусног деловања Протеин Киназа (ПК) система
(индиректни механизми антивирусног деловања)**

Важно је напоменути да је још један антивирусни одбрамбени механизам индукован IFN-ом, различит од 2'5' ОА-система и ПК система и специјализован је за дејство против influenza вируса типа А. Уочио га је **Lindenmann** још далеке 1963. године и констатовао да је једна врста инбредног мишијег соја (А2Г) потпуно резистентна на дозе "influenza" вируса типа А које су латентне за друге лабораторијске мишеве. То је довело до открића **Mx1 протеина**. Касније је примећено да је 75% врста мишева резистентна, а само 25% осетљива на овај вирус. Утврђено је да је ова отпорност мишева на леталне дозе "influenza" вируса типа А узроковано геном, који чине један активан и један или више инактивних алела. Овај ген је означен као **Mx ген** и присутан је у **свим сисарским ћелијама**. Индукује се **hIFN- α** и **hIFN- β** и смештен је на хромозому 21 код човека (21, 95, 96). Његов промотор (прекурсор) активира се не само IFN-ом већ и вирусном инфекцијом и садржи консензусне секвенце, које имају сви IFN индуцибилни промотори. Активан алел Mx гена садржи 14 ексона распоређених у оквиру 55 базних парова. Два инактивна алела Mx гена показују присуство делеција или мутација у одређеним ексонима (21). Молекулска тежина протеина кодираног Mx геном варира од 72 до 78 kD. Овај протеин се акумулира у једру мишје ћелије и у цитоплазми хумане ћелије. **Протеин Mx1 утиче на ћелијску отпорност на инфекцију RNK вирусима породице "Orthomyxoviride"**. **Продукат Mx гена драстично инхибира транскрипцију гена непознатим механизмом за који се зна да ствара резистенцију на инфекцију другим вирусима у истом организму. Mx1 протеин има молекулску масу од 72 kD и експримиран је у једру ћелија Mx1⁺ које су изложене дејству IFN- α и IFN- β . Насупрот IFN-има типа I, IFN- γ је слаб индуктор Mx1 протеина. Пронађен је и други Mx ген, Mx2 који је повезан са Mx1 на мишјем хромозому 16. Одговарајући Mx2 још увек није описан. У овим испитивањима закључено је да Mx1 протеин има антивирусну активност са селективним дејством на вирус "influenze" (13).**

Хумане ћелије изложене дејству **hIFN- α** и **hIFN- β** синтетишу два протеина **MxA** и **MxB** који показују знатну хомологију са мишјим Mx1 протеином. MxA протеин има молекулску масу од 76 kD, а MxB протеин 73 kD. Гени за ове протеине смештени су на хромозому 21. Хумани Mx протеини, предоминантно и готово искључиво су смештени у IFN-ом третираним ћелијама (13, 21, 96). У испољавању **антивирусне активности** IFN-и типа I и IFN типа II индукују важан ензимски систем **2'5' олигоаденилат синтетазу, која интерферира са продукцијом вирусних протеина ензимском разградњом вирусне RNK (13).**

Ако анализирамо **антивирусну активност IFN-а типа I** (слика 4) долази до њиховог везивања за интерферонске рецепторе на мембрани ћелије. Након тога долази до фосфорилације и активације субјединица фактора транскрипције у цитоплазми ћелија третираних IFN-има типа I. Долази до **синтезе више ензима** који су одговорни за развој "антивирусног стања" при чему су укључена два ензимска система:

- **протеин киназа (ПК) систем** - фосфорилише и инактивира ћелијски фактор иницијације и тако спречава стварање иницијалног комплекса потребног за синтезу вирусног протеина;
- **2'5'олиго аденилат синтетаза** - активира ћелијску ендонуклеазу (RNase L) која деградира mRNK вируса (13, 14, 17, 116).



Слика 4. Антивирусна активност IFN-а типа I (116)

2.9. Антипролиферативни ефекат

IFN-и су прва пронађена *група полипептида* за коју је утврђено да инхибирају раст ћелија. Они делују инхибиторно на раст нормалних и трансформисаних ћелија у концентрацијама које су нешто више од потребних за успостављање анти-вирусног стања. Ове концентрације IFN-а износе 50 пикограма – pg (10^{-9} g) до 5 нанограма – ng (10^{-6} g) по милилитру (ml) (21), или 1 до 1 000 IU/ml. Сви IFN-и имају инхибиторни ефекат на ћелијску пролиферацију, успоравају све фазе ћелијског циклуса, а у многим ћелијама изузетно G_0 и G_1 фазу. Инхибиторни ефекат на ћелијску пролиферацију нарочито је изражено код IFN- γ . (20). У овим испитива-

њима закључено је да **антипролиферативно дејство IFN-а укључује активацију једних и инхибицију других гена**. Експресија IFN-ом индукованих и IFN-ом репресованих гена је регулисана на исти начин као нормално обустављена ћелијска пролиферација **контактном инхибицијом** (21). Зато се сматра да **IFN-и инхибирају ћелијску пролиферацију активирајући одређени сет гена и координишу и балансирају експресију гена који нормално регулишу ћелијску пролиферацију** (21). Антипролиферативни ефекат IFN-а се посебно огледа не само у **активацији неких ћелијских гена**, већ и у **инхибицији других гена који инхибишу транскрипцију гена, посебно ћелијских прото-онкогена** (20).

IFN-и инхибише умножавање ћелија кроз неке до сада помињанутих механизма, посебно кроз инхибицију протеинске синтезе и преко инхибиције или супресије неких онкогена. Дакле, **антипролиферативни ефекат IFN-а може бити стање које успорава ћелијски раст и размножавање ћелија, заустављањем ћелијског циклуса у G_0 фази, због свеобухватне активности инхибиције синтезе протеина више од цитотоксичне активности**. Међутим, ова инхибиција није утицала на све типове ћелија и све услове у истом степену. Као и за антивирусну активност, **различити подтипови IFN-а носили су различиту антипролиферативну активност у зависности које су ћелијске линије коришћене и мешавине подтипова IFN-а имала је већу активност у зависности од компоненти IFN-а које су коришћене у експерименту**. Коначно, значајно је нагласити да **антипролиферативна активност различитих подтипова IFN-а има широк дијапазон варијација и ове разлике мењају се у односу на употребљену ћелијску линију** (14).

2.10. Имуномодулаторни ефекат IFN-а

Дејством IFN-а на одбрамбене ћелије организма (што укључује дејство IFN-а на макрофаге, Т- и Б- лимфоците, као и на ЛГЛ-ћелије - "large granular lymphocytes" - великих гранулираних лимфоцита и на ћелије са NK ("natural killer") **активношћу испољавју се имуномодулаторне активности IFN-а** (13, 19, 21). IFN-и повећавају цитотоксична својства макрофага у односу на бактерије и ћелије тумора повећавају се дејством IFN-а. Такође, IFN-и повећавају и њихову функцију акцесорних ћелија и поседују активности фактора који активира макрофаге – МАФ ("macrophage-activating factor") и активност фактора који спречава миграцију моноцита – МИФ

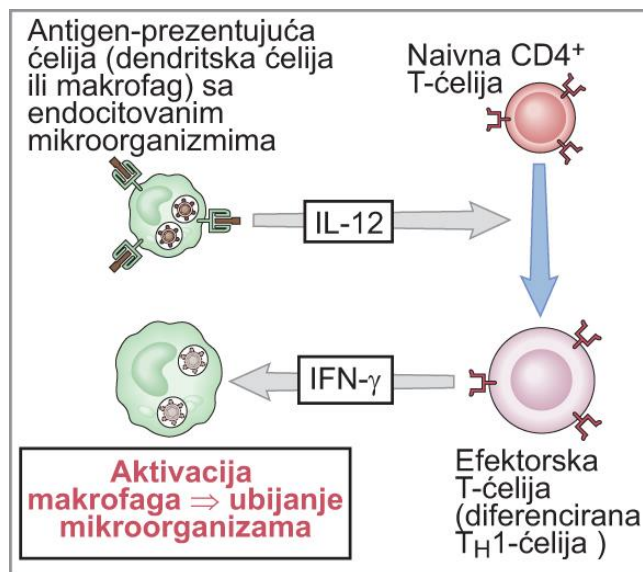
("monocyte migration inhibitory factor"). У остале МАФ спадају **IL-1**, **TNF- α** и **LT** (лимфотоксин). **IFN- γ** показује већу **МИФ-активност** од **IFN- α** и **IFN- β** (13, 19, 20).

IFN- γ је регулатор сигналних рецептора великог афинитета (K_d износи 10^{-8} до $10^{-9}M$) који су добили назив **ФцРИ (CD64)** експримираних на активираним макрофагима, али не и на интактним моноцитима. **IFN- γ** регулише транскрипцију **ФцРИ** гена. **ФцРИ** везује хумане имуноглобулине, и то **IgG1** и **IgG3**, обезбеђујући одржавање мономерних **IgG** у физиолошким концентрацијама антитела. Интерреакција са **IgG2** и **IgG4** много је слабија. Цитокини који доводе до функционалних промена на моноклеарним фагоцитима названи су МАФ. **IFN- γ** је главни МАФ и он сам одређује начин којим те ћелије активирају макрофаге. (13).

IFN- γ у потпуности активира макрофаге за убијање фагоцитованих микроорганизама, али само делимично активира макрофаге за убијање туморских ћелија. Активација макрофага **IFN-ом** је битна компонента одбране организма од инфекције бактеријама и протозоама. До сада су бројне студије показале да **бактерије** и **бактеријски продукти** могу индуковати продукцију **IFN-а** у различитим популацијама леукоцита. Такође је у овим студијама констатовано да **фибробласти** инфицирани интрацелуларним бактеријама продукују **ИНФ- α** и **ИНФ- β** . Бактериостатска и бактерицидна активност активираних макрофага која је посредована **IFN-има**, укључује и имуномодулаторне функције и директна дејства **IFN-а** на нелеукоцитне ћелије у правцу инхибиције бактеријске инвазије и инхибиције репликације вируса (13).

Макрофаги активисани IFN-ом испољавају морфолошке знаке сазревања што се испољава кроз: **повећање обима**, **појачање ширења макрофага по подлози** и **стварање псевдопода и вакуола**. Морфолошки знаци сазревања почињу након **првог сата од активације** и достиже **максимум током 48-72 часа** (22, 23). Активација макрофага са **IFN- α** , **IFN- β** и **IFN- γ** прати повећано исказивање рецептора за **Фц** део имуноглобулина (**ФцР** - "Фц рецептор"). Ово повећање експресије **ФцР** подстиче фагоцитозу имунокомплекса и способност макрофага да лизирају бактерије које су обложене антителима, паразите и ћелије тумора, Ово **повећање експресије Фц-рецептора** подстиче и **фагоцитозу имуних комплекса** и **способност макрофага да лизирају антителом обележене бактерије, паразите и ћелије тумора** механизмом **ћелијске цитотоксичности зависне од антитела – АДЦЦ** ("antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity"). У механизму **ћелијске цитотоксичности** молекули **антитела** спајају **макрофаге** са циљним ћелијама везујући се, с једне стране, за **Фц-рецепторе**, а, са друге стране за **одговарајуће антигенске детерминанте** (13, 19).

"Убијање" микроорганизама посредовано интерреакцијом макрофага и Т-лимфоцита сликовито је приказано у наредној шеми 5.



Шема 5. "Убијање" микроорганизама посредовано интерреакцијом макрофага и Т-лимфоцита (116)

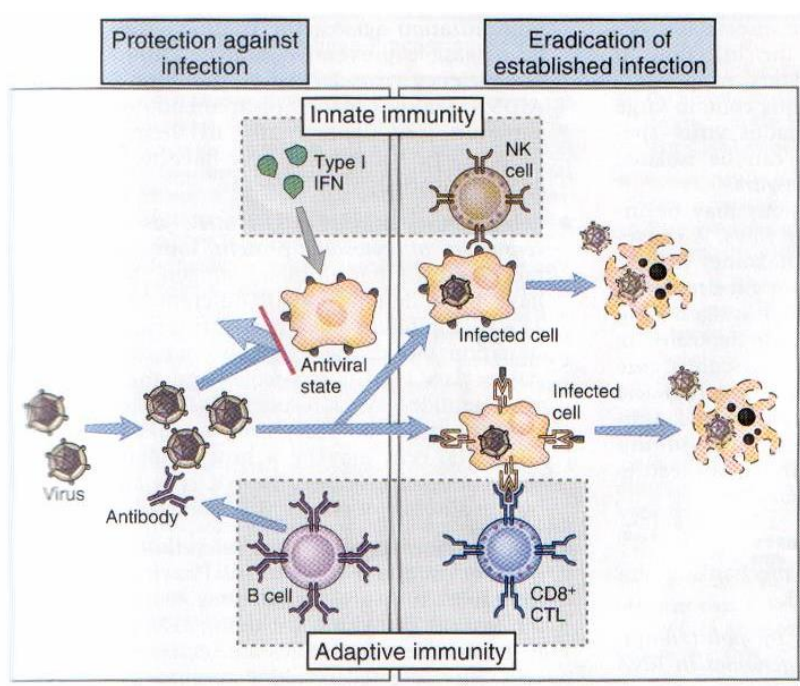
У изразите фагоците спадају: **неутрофилни гранулоцити, моноцити**, а нарочито **макрофаги**. Фагоцитирају сваку честицу која је антигенски страна организму и фагоцитоза се врши без помоћи лимфоцита, иако је фагоцитоза знатно олакшана присуством рецептора на мембрани лимфоцита за имуноглобулине и компоненте комплекса (**IgG1, IgG3, C3a C5a**) (13).

Првенствено **IFN- γ** , а у много мањој мери **IFN- α** и **IFN- β** , изазивају експресију већег броја **антигена класе II МНС** ("Major histocompatibility complex" - главни комплекс хистокомпатибилности). Првенствено **хуманих DR- антигена** или **мишијих Ia-антигена** налазе се на површини макрофага и на површини других ћелија. Делимично захваљујући повећаној експресији **Ia/DR антигена**, макрофаги изложени дејству **IFN- γ** и тиме је побољшана функција акцесорне ћелије, која се манифестује стимулацијом реакције мешане културе лимфоцита (19).

Имуномодулаторни ефекат **IFN-а** детектује се на два поља дејства: **хуморалним имуним одговором** и **ћелијским (целуларним) имуним одговором** (19, 20). **IFN** може повећати или потиснути ћелијски и хуморални имуни одговор, што зависи од дозе, времена давања и генетског кода примаоца. Давање **IFN-а** или индуктора **IFN-а in vivo**, пре или у исто време са антигеном, има знатна потискујућа дејства. Насупрот томе, давање **IFN-а** после сензибилизације антигеном повећава и целу-

ларни и хуморални имуни одговор. То је од већег физиолошког значаја с обзиром на то да се IFN ствара релативно касно током нормалног типа имуног одговора. *In vitro* супротна дејства IFN-а се могу доказати. Инхибишу се лимфопролиферативне реакције и стварају антитела *in vitro*, претходним или истовременим додавањем великих доза IFN-а. Насупрот томе, мале дозе IFN-а и његово касније додавање могу повећати пролиферацију лимфоцита и стварање антитела. IFN има и позитивна и негативна дејства на феномене целуларног имунитета као што су реакције касне преосетљивости, реакција трансплантата против домаћина и реакција мешане културе лимфоцита (19).

Механизам урођеног и стеченог имунитета против вируса сликовито је приказан у шеми 6 (120).



Шема 6. Механизам урођеног и стеченог имунитета против вируса (120)

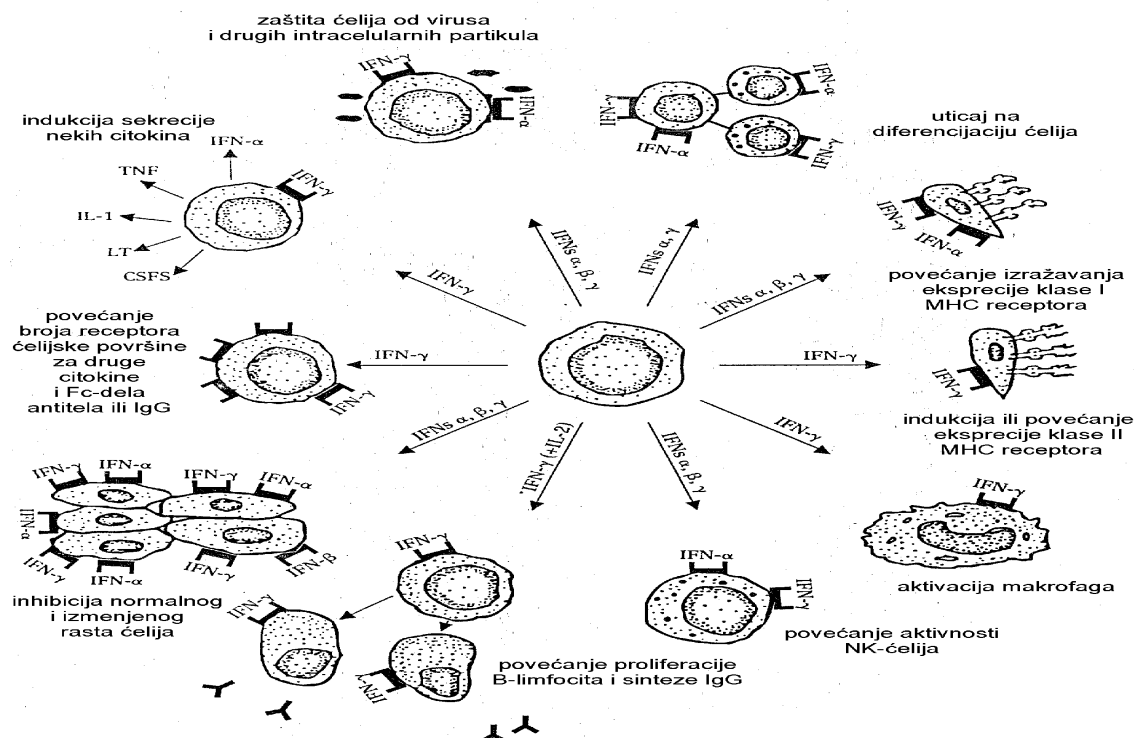
У оквиру целуларног имуног одговора пронађено је да IFN-и мењају функционалну активност многих ћелија. Највећи број ћелија има на својој површини експримирану (исказану) класу I МНС (главни комплекс хистокомпатибилности) антигена. Експресија класе II МНС антигена у здравом организму је ограничена на моноците, активирани Т-лимфоците, Б-лимфоците и поткласе других ткива (20). IFN-и утичу на целуларни имунитет повећавајући експресију антигена хистокомпатибилности. На мембранама многих ћелија повећава се ниво антигена хистокомпатибилности не само класе II, већ и антигена класе I, након излагања дејству

IFN-а ових ћелија. Повећана експресија антигена МНС класе I повећава антигенност ћелија и тиме ове ћелије постају боља мета за цитотоксичне Т-лимфоците који специфично препознају МНС антигене класе I. Покретање антиген-специфичног Т-лимфоцитима посредованог имуног одговора захтева препознавање антигена од стране помоћничког ("helper") Th-лимфоцита повезаног са антигенима класе II МНС (19, 20). IFN- γ самостално утиче на експресију класе II МНС антигена и тиме проузрокује експресију класе II МНС антигена на површини ћелија које их нормално не поседују (као што су фибробласти и ендотелне ћелије). IFN-и појачавају и број рецептора на површини мембране моноцита за Фц део имуноглобулина, као и рецепторе за друге цитокине (20, 21).

Неке регулаторне активности IFN-а на ћелије приказане су на слици 5 (20).

Механизми помоћу којих IFN-и повећавају целуларни и хуморални имуни одговор су комплексни и за сада недовољно разјашњени. Они се делимично заснивају на повећаној експресији класе II МНС антигена, на повећаном присуству класе I МНС антигена на ћелијама које су мета цитотоксичних Т-лимфоцита, на повећаном стварању IL-1, као и на непосредним дејствима IFN-а на диференцијацију Т- и Б-лимфоцита. Имуносупресивна дејства IFN-а у вези су са његовом антипролиферативном активношћу и/или са активацијом супресорских Т (Ts)- лимфоцита (19).

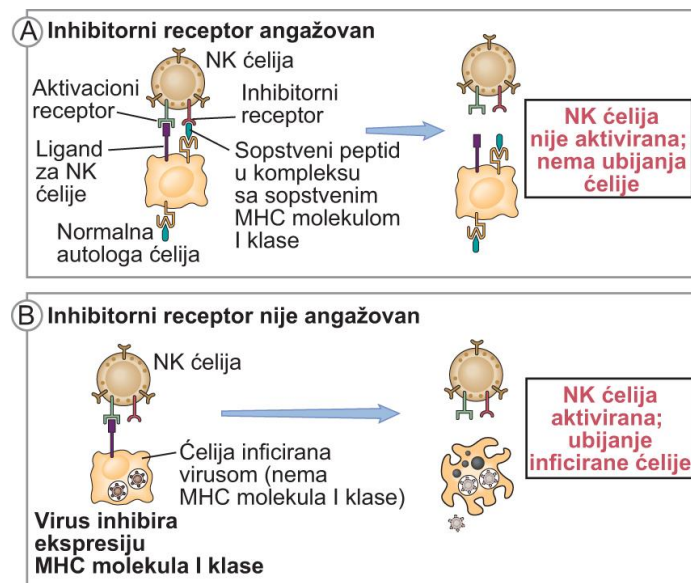
Познато је да IFN- α , IFN- β и IFN- γ стимулишу НК-активност одређених ћелија и диференцијацију пре-NK ћелија у зреле (функционалне) NK-ћелије (20). НК-активност испољава се цитотоксичним дејствима ЛГЛ-ћелија, без претходне сензибилизације на вирусом заражене ћелије, на ћелије неких туморских линија и на хематопоезне ћелије. Давањем IFN- α , IFN- β и IFN- γ или индуктора IFN-а, како *in vitro* тако и *in vivo*, појачава се НК-активност ЛГЛ-ћелија. Истраживања су показала да IFN- α појачава више *in vitro* НК-активност него IFN- γ (19). За време интеракције са њиховим мета ("target") ћелијама NK-ћелије саме стварају IFN-е (20). IFN- γ повећава активност Т-лимфоцита помоћу алогених лимфоцита (утичући и на пролиферацију и на цитотоксичност) и то деловањем првенствено на CD8⁺ обележене Т-лимфоците. Неутралишућа антитела за IFN- γ супримирају пролиферацију и развој цитотоксичности у тим културама алогених лимфоцита (20).



Слика 5. Неке регулаторне активности IFN-а на ћелију. Према F.R. Balkвил-у (20).

2.11. Антитуморско дејство IFN-а

У регулацији раста тумора IFN-и имају веома важну улогу. На три начина се остварује антитуморско дејство IFN-а, и то: 1) директним регулаторним ефектом на туморске ћелије (модулирају раст тумора) утичући на диференцијацију тумора; 2) дају одговор на факторе раста и 3) врше експресију ћелијских антигена. Антитуморска дејства IFN-а приписују се и његовим *антипролиферативним деловањима* и својству да *појача антитуморске одговоре организма*. IFN-и као имуномодулаторне супстанце иницирају или појачавају већ постојећи имуни одговор домаћина на присуство тумора. Такође, IFN-и показују и регулаторне ефекте на интерреакције домаћин-тумор које нису здружене са имуним одговором. Важно је напоменути да *IFN-и инхибиторно делује на раст онкогених вируса*, па се може закључити да IFN-и с правом носе назив "*антитуморски агенс*" (19-21, 57). Шематски приказ препонавања заражених и туморских ћелија сликовито је дат у шеми 6 (116).



Шема 7. Шематски приказ препознавања заражених и туморских ћелија (116)

Теоретски гледано, амтитуморска активност IFN-а заснива се на бар пет механизма феловања: **1) цитостатски ефекат; 2) повећање цитотоксичности; 3) утицај на диференцијацију; 4) кроз повећање имуногености тумора и 5) модулацуја експресије антигена.** Неки од ових механизма идентификовани су као значајни ефектор регресије тумора у само неколико клиничких случајева. То је случај код **леукемије власних ћелија**, где се ефекат диференцијације **власних ћелија** може постићи **веома ниским дозама hIFN-а**. Идеја са којом се започела терапија hIFN-а је да он делује преко утицаја на диференцијацију, заснива се и на доказима да се комплетни хематолошки одговор не подудара са настанком прекурсора власних ћелија у костној сржи. Диференцијација је од значаја у **хроничној мијелоидној леукемији**, али је овде у питању комплекснији механизам **јер су потребне више дозе hIFN-а за подизање хематолошке ремисије и сама Phil+ ("Филаделфија") ћелија** у периферној крви и костној сржи. Претпоставља се да цитостатски ефекат нема значајну улогу, јер се давањем и повећањем дозе **hIFN-а постиже значајно већа негативизација Рхил+ ћелија** него **хемотерапијом**. Деловање на диференцијацију може се објаснити **терапијски ефекат код есенцијалне тромбоцитозе**, где до пада броја тромбоцита долази због смањеног броја и способности раста мегакариоцита, и у **есенцијалној криоглобулинемији**, где патолошки глобулини брзо нестају из циркулације (13, 21).

У новије време интензивно се покушава да се искористе **антипролиферативне и имуномодулаторне активности IFN-а за третман карцинома хуманог порекла**. Бројна клиничка испитивања предузета су у **лечењу IFN-ом како леукемија и лимфо-**

ма, тако и карцинома (18-21, 96). Прве студије започео је **Stander** са сарадницима (1972), и тада су приказани *изузетно повољни ефекти IFN-а код болесника са остеосаркомима* (17, 21). Они су постигли добре резултате и у употреби IFN-а код деце са ларингеалним папиломом (17, 21). Клиничким испитивањима добијени су повољни резултати у лечењу IFN-ом метастатских тумора, као што су: лимфоми, мултипли мијелом, карцином бубрега и карцином грудне дупље. На третман hIFN- α најосетљивија је леукемија власстих ћелија (ХЦЛ), редак тумор Б-лимфоцита. Други тумори осетљиви на исту терапију су хронична мијелоцитна леукемија (ЦМЛ), Т-ћелијски лимфом, "Кароси"-ев сарком, неоплазме ендокриног дела панкреаса и туморе Б-лимфоцита. Препарати rIFN-а најефикаснији су код тумора који су пореклом из зрелих Б-лимфоцита и плазма ћелија. Тумори који потичу из пре-Б или незрелих Б-лимфоцита (акутна леукемија, дифузни лимфоми и хронична лимфоцитна леукемија) имају слаб одговор на третман rIFN-а (18-21, 23). Код мултипног мијелома нема доброг терапијског одговора на hIFN-а у току прогресије болести, али давање hIFN-а у току ремисије доводи до значајног смањења рецидива и продуженог преживљавања. У принципу, солидни тумори слабо или ни мало не реагују на IFN (13). Табела 4 приказује ефикасност IFN-ске терапије за различите хумане туморе изражена у процентуалном односу комплетнеилипарцијалне ремисије (21).

Табела 4. Антитуморска активност IFN-а према В. N. Fields-у (21)

Врста тумора	Процентуални однос (%) комплетне/парцијалне ремисије
Леукемија власстих ћелија	90%
Хронична мијелоцитна леукемија	90%
Лимфоми (који воде порекло од Т-лимфоцита)	53%
"Кароси"-ев сарком	42%
Неоплазме ендокриног дела панкреаса	30%
"Non-Hodgkin"-ови лимфоми	25-35%
Карцином бубрега	10-25%
Мултипли мијелом	10-25%
Карцином грудне дупље	0-25%
Меланом	3-20%
Карцином колоне	5%
Бронхогени карцином	0-2%

2.12. IFN-и као цитокини и лимфокини

Као што је већ речено, у групу цитокина сврстани су и IFN-и заједно са бројном фамилијом протеина мале молекулске масе јер суделују у индукцији, стимулацији и сузбијању експресије гена. Своје регулаторне ефекте на ћелију IFN-и остварују у интерреакцији са цитокинима. Цитокини посредују у ћелијској комуникацији следећим механизмима:

- а) под утицајем различитих стимулуса укључујући индукцију помоћу других цитокина стварају се у једном типу ћелија;
- б) након секреције реагују са специфичним рецепторима на ћелијској мембрани;
- ц) код многих ћелијских типова регулишу пролиферацију и диференцијацију;
- д) у зависности од типа ћелије и стања диференцираности утичу на низ ћелијских функција (21, 96).

Цитокини су познати и као лимфокини јер продукују ћелије имуног система и делују имуномодулаторно. Због тога што ћелијска хомеостаза представља равнотежу између ефеката проузрокованих различитим цитокинима. Цитокини и лимфокини често имају антагонистичке биолошке ефекте. Зато цитокини и лимфокини заједно чине цитокинску мрежу (21).

У цитокинским карактеристикама преобладајуће особине IFN- β садржане су у следећим чињеницама:

- А) Синтеза IFN- β индукована је у ћелијама костне сржи помоћу ЦСФ-01 (фактора раста хематопоезних ћелија).
- Б) L-1 инхибише синтезу IFN- β у фибробластима.
- Ц) TNF (фактор некрозе тумора) и IFN- β делују синергистички и потенцирају узајамно антивирусни ефекат.
- Д) IFN- β игра главну улогу у TNF- α посредованом повећању експресије класе I МНС антигена на ћелијској површини.
- Е) Способност експресије поседује сам IFN- β и то контролише аутокрином регулацијом.
- Ф) IFN- β је један од посредника способних да индукују стварање једног моћног и веома променљивог цитокина који је прво назван IFN- β 2. Он је

преименован у **IL-6**. **IFN- β 2** поседује аминотерминални регион који испољава неке секвенце сличне **Г-ЦСФ** ("фактор раста гранулоцитопоезе"). Карбокси терминални регион има неке секвенце сличне са **IFN- β** . Зато **IFN- β 2** има особине сличне и **IFN-има** и цитокинима, али су јаче израженије цитокинске карактеристике од особина сличних **IFN-има**. **IFN- β 2** /**IL-6** продукован је од стране широког спектра ћелија које обухватају **фибробласте, епителне ћелије, моноците и Т-лимфоците и идентичан** је са стимулишућим фактором за Б-лимфоците – **БСФ-2** (продукован је помоћу Т-лимфоцита и стимулише Б-лимфоците у сазревању и продукцији антитела); са хепатоцито-стимулишућим фактором – **ХСФ** (изазива са **IFN- α** акутну фазу протеинског одговора у ћелијама јетре) (21).

Нису изненађујуће карактеристике лимфокина за **групу α -интерферона**. Код групе **IFN- α** експресија је јаче изражена од **IFN- β** . **α -интерферони** индукују експресију класе **I** МНС антигена, инхибишу пролиферацију прогенитора хематопоезе и поседују секвенце сличне одређеним гликопротеинима који посредују у адхезији између лимфоцита, моноцита и гранулоцита (**ЛФА-1** и **Мац-1**). Они играју главну улогу за време ембриогенезе и имају сличне особине као и цитокини. Битно је нагласити да су различите **α -интерферонске специфичности** индуковане до високог нивоа на различитим степенима ембриогенезе, а два **α -интерферона** (**IFN- α 1** и **IFN- α 2**) изражена су на ниским нивоима у различитим органима нормалних особа (21).

2.13. Улога IFN-а у болестима

Улога **IFN-а** у болестима огледа се у чињеници да је потребно одржавање стабилног нивоа **IFN-а** у здравом организму јер ћелије нити синтетишу, нити садрже **IFN**. У тим условима тешко је **IFN** открити у ткивима или у серуму. Под утицајем великим бројем различитих агенаса (**вирусне инфекције, ds RNK, различити метаболички активатори и инхибитори**), синтеза **IFN-а** може бити индукована (15-7, 19-21, 24-6, 46, 47, 56-9, 96). Са системском реакцијом преосетљивости (настала као последица интравенског убризгавања велике количине одговарајућег антигена), **IFN** се јављају и у серуму у мерљивим концентрацијама у експерименталних животиња (19-21, 47).

IFN је откривен у мерљивим концентрацијама у серуму неких болесника са клинички активним аутоимуним болестима, укључујући системски еритемски лупус, реуматоидни артритис, склеродермију и "Sjogren"-ов синдром. У серуму болесника са системским еритемским лупусом налази се подврста IFN- α названа ацидолабилни IFN- α јер је непостојана у киселој средини (19-21, 57). Да IFN- α има заштитну улогу у вирусним болестима указује чињеница да давањем IFN- α или индуктора IFN- α , може спречити развој вирусних болести. То проузрокује основно антивирусно дејство IFN- α , а делимично и његово пирогено дејство, јер повишена температура неповољно делује на репликацију неких вируса. Чак је запажено да IFN- α има антивирусни ефекат и код имунодефицијентних болесника. Давањем антитела на IFN- α доводи до погоршања вирусних инфекција (19-21, 57-9). IFN- α штите од вирусних болести. Нека испитивања (57) доказала су и учешће IFN- α у ХИВ инфекцији. То је доказано продукцијом IFN- α и IFN- γ у ХИВ инфицираних болесника, а то показује и њихову повезаност са имунодефицијентним стањем, као и повећањем нивоа ацидолабилног облика IFN- α у серуму ових болесника и он се може употребити као један од преклиничких маркера у дијагнози ХИВ-а, као и повећањем NK-активности *in vitro* у ХИВ инфекцији (у већем степену помоћу IFN- α и IFN- β , док IFN- γ има мањи ефекат на NK-активност).

2.14. Перспективе за клиничку употребу IFN- α

Након открића IFN- α у шестој деценији двадесетог века, покушало се да се у клиничким испитивањима експлоатише његов снажан антивирусни ефекат и својство да регулише ћелијске функције. Прве студије усмерене су ка искоришћавању антивирусне активности IFN- α (значај његовог његовог открића упоређиван је са открићем пеницилина јер се сматрало да је пронађен лек који ће да контролише вирусну инфекцију, као што је пеницилин био моћно антибактеријско средство). Снажан антивирусни ефекат IFN- α примењен је интраназалном администрацијом IFN- α и IFN- β и тиме је смањена учесталост болести и инфекције које су везане за природну изложеност различитим респираторним вирусима (нарочито "рино"вирусима). Показало се мало вероватним да ће IFN-и бити широко употребљени као антивирусни агенси у обичном неживом третману вирусних инфекција, али показало се да IFN-и могу бити корисни у живим третманима инфекција (рабијес, хеморагијска

грозница и инфективни енцефалитис). IFN-и могу побољшати или чак елиминисати перзистентне инфекције вируса хепатитиса типа Б, херпес зостера, папилома вируса и цитомегаловируса (17-21, 56, 57). IFN-и су се показали делотворним и у третману "херпес симплекс" кератитиса и инфекције изазване "varicela zoster" вирусом код имунокомпромитованих болесника као и у превенцији инфекције и реинфекције "цитомегаловирусом" у прималаца трансплантата бубрега (56).

Ако се сагледају перспективе за клиничку употребу IFN-а, генерално се може закључити да, терапијска примена IFN-а може бити ефикасна у третману болесника са:

- а) **Вирусним инфекцијама** ("херпес симплекс", "херпес зостер", "варичела", хронични хепатитис изазван "вирусима типа Б и Ц");
- б) **Другим инфекцијама** (хронична грануломатозна болест);
- в) **Појединим солидним тиморима** (ограничен ефекат), а **бољи терапијски учинак је показан код хематолошких тумора** (остеосарком, карцином бубрега, леукемија власстих ћелија, хронична мијелоидна леукемија и други) (13).

Посебо се у новије време ради на испитивању *антипролиферативне и имуномодулаторне активности IFN-а у третману хуманих карцинома*. Клиничким испитивањима сагледане су делотворности *лечења препаратима IFN-а како код хематолошких малигнитета (леукемија и лимфома), тако и код солидних тумора и карцинома* (23). Прве студије радио је **Stander** са сарадницима испитујући **ефикасност деловања IFN-а на остеосаркоме**, а добијени су и **повољни ефекти деловања IFN-а на метастатске туморе (лимфоми, мултипли мијелом, карцином бубрега и карцином грудне дупље)** (21, 23).

Иако је **антитуморско дејство hIFN- α на солидне туморе веома ограничено**. Он показује **значајну антитуморску активност на хематолошке малигнитете**. **Најосетљивији на третман препаратима hIFN- α су леукемија власстих ћелија** (више од 90% ових болесника изврсно реагује на овај третман и нормализује се број нормалних ћелија у периферној крви), **хронична мијелоцитна леукемија** (делује на нормализацију ћелија периферне крви, али се не губи "Philadelfija" хромозом), **кожни Т-ћелијски лимфоми** (дају добар терапијски одговор), **"non Hodgkin"-ови лимфоми ниског степена малигнитета** (код око 50% болесника се јављају повољни терапијски ефекти) и **"Kaposi"-ев сарком** (17-21), као и **"kondilomata akumunata"** (гениталне брадавице) и друге **бенигне неоплазме повезане са инфекцијом хуманим папилома вирусима**.

Добар терапијски одговор на третман **hIFN- α** запажен је код "јувенилне ларингеалне папиломатозе", и треба га продужити због могућности рецидива (17).

О значају и перспективама клиничке употребе IFN-а најбоље говоре терапијске индикације IFN-а које су признате у Регистрима лекова Србије и Велике Британије за 2011. годину, а то су:

- Вирусни хронични хепатитис (типа Б и Ц)
- Хронична мијелоидна леукемија;
- "Kaposi"-ев сарком (као последица AIDS-а);
- Лимфоми;
- Малигни меланом (као адјуванс хируршком лечењу);
- Мултипла склероза;
- Неки солидни тумори;
- Узнапредовали карциноми реналних ћелија.

2.15. Извори за производњу хуманих интерферона за клиничку примену

Хумани леукоцити који се као нус-продукат, после издвајања "buffy coat"-а (БЦ) и одбацивања као штетан продукт за хемотерапију (терапија крвљу и крвним продуктима) при обради јединице целе крви-ЈЦК (из којих се припремају препарати концентрованих тромбоцита) користе се као главни извор за производњу hIFN-а за клиничку примену. Најпре се ЈЦК, не старија од 6 сати од узимања од добровољно даваоца, центрифугује и из ње издваја плазма, а затим "дилуирани buffy coat" (БЦ-I) који поред плазме (око 50 ml), садржи тромбоците, леукоците и еритроците (2, 44-57). Поновним диферентним центрифуговањем из БЦ-I издвајају се тромбоцити, а као нус-продукат остаје "buffy coat сиромашан у тромбоцитима" (БЦ-II) који садржи највећи број леукоцита и еритроцита и често је називан "суви БЦ" (1-4, 8-13, 26, 31-9).

Нису разрађени други биотехнолошки поступци за припремање хуманих леукоцита из ЈЦК за производњу hIFN-а, до сада, нити су вршена опсежна испитивања квалитета (морфологија, вијабилност) леукоцита из БЦ-а, намењених за производњу hIFN-а. Нису чак детаљно испитани нити време, нити начин складиште-

ња јединица БЦ-II од момента припремања до њихове примене као сировине за производњу hIFN-а.

"Одсек за производњу интерферона Института за имунологију и вирусологију Торлак" из Београда за производњу hIFN-γ користио је леукоците из БЦ-а, употребом модификованог Cantell-овог метода. Пречишћавање леукоцита из пулова БЦ-а, односно одстрањивање свих адхерентних серумских протеина и добијање пречишћене подлоге леукоцита вршено је помоћу 0,83-тро процентног раствора амонијум хлорида (0,83% NH_4Cl). Тако припремљена подлога леукоцита излагана је **вирусној индукцији**, коришћен је "Sendai" вирус, култивисан на хорион-алантоичној мембрани пилећег ембриона. **Индукција синтезе hIFN-γ** одигравала се на **температури од 37 °C**, током **18 сати**. После завршене биосинтезе hIFN-γ, **вирус-индуктор је инактивиран хемијским поступком**. **Ослобађање непожељних пратећих протеина** врши се њиховим **таложењем амонијум сулфатом**, а **финално пречишћавање hIFN-γ** вршено је **модификованим хемијским поступком** (39-42, 121).

У нашој студији, за пречишћавање суспензије леукоцита користили смо растворе 10% декстрана и 6% хидроксиетилног скроба (ХЕС) високе молекулске масе као рулоформирујућих агенаса за еритроците. Пречишћену суспензију леукоцита ресуспендовали смо у MEM-у ("минималном есенцијалном медијуму") обогаћеном хуманим албуминима, на температури од 36 °C (849 ml MEM-а вредности рН од 7,35; 50 ml А-гама (γ) серума - 20 mg/ml), коришћена је за биотехнолошки поступак **продукције hIFN-γ**. У овако припремљену подлогу додавали смо **ресуспендовану пречишћену суспензију леукоцита и третирали је са лиофилизованим фитохемаглутинином-ПХА-II као индуктором синтезе за hIFN-γ** (њего производи "ИНЕП" – Земун, користи се 50mg суве материје која се раствора у 5 ml редестиловане воде и додавана је у количини од 1 ml или 10 μg/ml). У биотехнолошком поступку кога смо изводили у нашој студији **индукција хуманих леукоцита лиофилизованим фитохемаглутинином у продукцији hIFN-γ трајала је 48 сати на +37 °C и 24 сата на +40 °C**, уз перманентно мешање на магнетној мешалици у воденом купатилу. Након завршене индукције hIFN-γ, **смеса је центрифугована 40 минута на 4 000 x g, при температури од +4 °C**. Овим поступком добијен је **сиров hIFN-γ**. **Даља концентрација сировог hIFN-γ** вршена је **центрифуговањем на 5 000 обртаја, 60 минута на температури од +40 °C** (122).

3. ХИПОТЕЗА

Уколико се у припреми и обради "buffy coat"-а (БЦ-а) примене три додатна поступка (ускладиштењем јединица buffy coat-а на константној температури од 22 °C, уз стално хоризонтално трешење брзином од 80 обртаја/минут и применом раствора 10% декстрана и 6% хидроксиетилног скроба високе молекулске масе као руло-формирајућих агенаса за еритроците), постигли бисмо непромењену морфологију леукоцита у пречишћеној суспензији леукоцита, бољу вијабилност, већу индукциону способност и већи принос хуманих леукоцита, а посебно неутрофила.

Овим биотехнолошким поступком омогућићемо продукцију биолошки потпуно нетоксичног хуманог интерферона-гама из пречишћене суспензије хуманих леукоцита под утицајем фитохемаглутинина (индуктора синтезе биљног порекла).

Према томе, новим биотехнолошким поступком продукције интерферона-гама уз коришћење лиофилизованог фитохемаглутинина као индуктора синтезе, из пречишћене суспензије хуманих леукоцита добићемо већи принос и бољи титар произведеног финалног препарата хуманог интерферона-гама из суспензије хуманих леукоцита, у односу на до сада коришћен модификовани "Cantell"-ов метод.

Овим испитивањима доказаћемо да је овај биотехнолошки поступак у предности у односу на до сада коришћен модификовани "Cantell"-ов метод за продукцију хуманог интерферона-гама.

4. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Циљеви истраживања су да се утврди:

1. **Оптимални период складиштења јединица БЦ-а, од узимања крви од добровољних давалаца, до њеног процесирања и издвајања пречишћене суспензија леукоцита намењене за синтезу hIFN- γ из пречишћене суспензије леукоцита.**
2. **Зависност приноса hIFN- γ у односу на старост пречишћене леукоцитне суспензије.**
3. **Утицај константне температуре (+22 °C) и хоризонталног трешења током складиштења препарата БЦ-а на вијабилност, принос и индукциону способност леукоцита, намењених за продукцију hIFN- γ из пречишћене суспензије леукоцита.**
4. **Постојање разлика у морфологији, приносу, индукционој способности леукоцита припремљених из јединица БЦ-а складиштених на константној температури (+22 °C), уз перманентно хоризонтално трешење (брзином од 80 обртаја/минут) намењених у биотехнолошком поступку за продукцију hIFN- γ из пречишћене суспензије леукоцита када се као индуктор синтезе користи лиофилизовани фитохемаглутинин (препарат биљног порекла), у односу на до сада коришћен модификованим "Cantell"-ов метод за продукцију hIFN- γ , када се у пречишћену леукоцитну суспензију припреману досадашњим биотехнолошким поступком којим се непосредно после припреме складишти на амбијенталној температури (18-22 °C) без хоризонталног трешења, као индуктор синтезе додаје се "Sendai" вирус, култивисан на хорион-алантоичној мембрани пилећег ембриона.**
5. **Утицај примене рулоформирајућих агенаса за еритроците (раствора 10% декстрана и 6% хидроксиетилног скроба високе молекулске масе) на степен пречишћености леукоцитне суспензије намењене за биотехнолошки поступак продукције hIFN- γ уз коришћење лиофилизованог фитохемаглутинаина као индуктора синтезе, у односу на досадашњи биотехнолошки поступак пречишћавања леукоцитне суспензије применом раствора 0,83% NH₄Cl модификованим "Cantell"-овим методом за продукцију hIFN- γ и као индуктор синтезе додаје**

- се "Sendai" вирус, култивисан на хорион-алантоичној мембрани пилећег ембриона.
6. Појединачне предности и недостатке биотехнолошког поступка производње hIFN- γ из пречишене суспензије леукоцита у односу на до сада коришћен модификовани "Cantell"-ов метод за продукцију hIFN- γ ;
 7. Разлику у титру hIFN- γ добијених из пречишене леукоцитне суспензије припремљене из јединица БЦ-а складиштених на константној температури и уз перманентно хоризонтално тресење и коришћења фитохемаглутинаина као индуктора синтезе hIFN- γ , у односу на леукоцитну суспензију припремљену из јединица БЦ-а добијених досадшњим устаљеним биотехнолошким поступком модификовани "Cantell"-ов метод за продукцију hIFN- γ где се као индуктор синтезе коришћен "Sendai" вирус, култивисан на хорион-алантоичној мембрани пилећег ембриона.
 8. Могућност увођења новог биотехнолошког поступка у припреми, складиштењу и даљој обради јединица БЦ-а намењених за продукцију hIFN- γ из пречишене суспензије леукоцита и уз коришћење фитохемаглутинаина као индуктора синтезе hIFN- γ .
 9. Предности употребе биотехнолошког поступка продукције hIFN- γ из пречишене суспензије хуманих леукоцита и коришћења фитохемаглутинаина као индуктора синтезе hIFN- γ , у односу на досада коришћен модификован "Cantell"-ов метод за продукцију hIFN- γ где се као индуктор синтезе коришћен "Sendai" вирус, култивисан на хорион-алантоичној мембрани пилећег ембриона.
 10. Могућност увођење новог биотехнолошког поступка продукције hIFN- γ из суспензије хуманих леукоцита уз коришћење фитохемаглутинаина као индуктора синтезе hIFN- γ у свакодневну производњу и клиничку употребу код нас у Р. Србији.

5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Да би се остварили циљеви овог истраживања испитано је **384 јединица "buffy coat-a" (БЦ)** за производњу hIFN- γ . Испитиване јединице БЦ-а подељене су у три серије по 128 јединица БЦ-а у контролној (КСБЦ) и две експерименталне серије (ЕСБЦ-I и ЕСБЦ-II) подељене у 16 пулова (по 8 јединица за сваки пул у испитиваним серијама).

Јединице БЦ-а испитиваних серија, контролне (КСБЦ) и експерименталних серија (ЕСБЦ-I и ЕСБЦ-II), припремали смо из јединица целе крви (не старије од 6 сати). Јединице целе крви (ЈЦК) узете су од небираних, здравих давалаца (старости од 18 до 65 година) у систему пластичних кеса, и то у волумену од 450 ml крви у 63 ml раствора цитрат-фосфат-декстрозе, као антикоагуланс-конзервишући раствор. Све ЈЦК тестиране су ензимоимунних ("ELLISSA") тестова треће генерације, на присуство маркера трансфузијски-трансмисивних инфекција (хепатитис типа Б и Ц, вирус хумане имунодефицијенције - ХИВ и луес).

Припремљене јединице БЦ-а приказане су на слици 6.



Слика 6. Јединице buffy coat-a
(припремљене аутоматизованим поступком издвајања крвних ћелија)

Након диферентног центрифуговања ЈЦК, уз употребу центрифуге "Hettich-Roto Silenta RP" ("Hettich, Tuttlingen", Немачка), користили смо процесор крвних ћелија, апарат "Т-АЦЕ" ("Terumo", Токио, Јапан) и њиме смо аутоматизованим поступком раздвајали поједине крвне компоненте из ЈЦК (слика 7). Овим аутоматизованим поступком из ЈЦК издвајали смо БЦ (просечно смо издвајали 50 ml по јединци БЦ-а), плазму и концентроване еритроците. Надаље смо концентроване еритроците ресуспендовали у специфичном адитивном раствору.



Слика 7. Процесор крвних ћелија, апарат "Т-АЦЕ"
(аутоматизовано раздвајање крвних компоненти из јединица целе крви)

Јединице БЦ-а контролне серије (КСБЦ) припремали смо до сада коришћеном модификованом "Cantell"-овом методом за продукцију hIFN- γ . Свака серија КСБЦ складиштена је на амбијенталној температури која се кретала од 18 до 22 °C и складиштење је трајало је не дуже од 16 сати од припремања БЦ-а. Јединице БЦ-а експерименталних серија (ЕСБЦ-I и ЕСБЦ-II) складиштене су у инкубатору ("Cooled Orbital Incubator, Gallenkamp, Leics", Велика Британија), на константној температури од +22 °C, уз перманентно хоризонтално тресење (80 обртаја/минут) (слика 8). Складиштење јединица БЦ-а експерименталних серија (ЕСБЦ-I и ЕСБЦ-II)

трајало је исти временски период као и контролне серије, односно не дуже од 16 сати од припреме БЦ-а.



Слика 8. Складиштење јединица buffy coat-а у инкубатору

Сваку испитивану серију БЦ-а пулирали смо у стерилним условима уз поштовање принципа асепсе и антисепсе (пулирали смо по 16 јединица БЦ-а и то тако што смо мешали 2 пула од по 8 јединица БЦ-а за сваку испитивану серију). Јединице БЦ-а пулирали смо у засебне, обележене дволитарске силиконизирание стаклене боце, и то:

- Пул КСБЦ складиштили смо сат времена у хладној комори на температури од $+4^{\circ}\text{C}$ према досадашњој процедури, коришћењем модификованог "Cantell"-овог метода за продукцију hIFN- γ ;
- Пулу ЕСБЦ-I додавали смо 10% раствор декстрана молекулске масе (ММ) 250 000 Далтона – D [припремали смо га из суве - лиофилизоване супстанце декстрана са стерилним раствором 0,9% NaCl, а у сразмери 9 волумена БЦ-а и 1 волумен 10% раствора декстрана (према "Европској фармакопеји", 5-то издање из јуна 2004. године; као и енциклопедији хемикалија лекова и биолошких производа - "The Merck Index" 6-то издање из 2006. године (97-9)]. Издајање супернатантне суспензије леукоцита вршили смо после једносатног спонтаног седиментисања еритроцита, а помоћу наменских стерилних металних игала прикључених на вакум пумпу;
- Пулу ЕСБЦ-II додавали смо једнак волумен "Plasmasterul"-а (шесто процентни раствор хидроксиетилног скроба – 6% ХЕС-а, молекулске масе 450 000 Д (далтона), фирме "Fresenius AG", Немачка; према енциклопедији

хемикалија лекова и биолошких производа - "*The Merck Index*" 6-то издање из 2006. године) (100). **Издавање супернатантне суспензије леукоцита вршили смо после једносатног спонтаног седиментисања еритроцита на амбијенталној температури (18-22 °C), на исти начин као и из пула ЕСБЦ-I.**

Пречишћавање суспензије леукоцита из КСБЦ, односно одстрањивање свих адхерентних серумских протеина и добијање пречишћене подлоге леукоцита, вршили смо лизирањем еритроцита раствором 0,83% NH_4Cl , устаљеним поступком који смо до тада користили. Пречишћавање суспензије леукоцита из КСБЦ изводили смо тако што смо један волумен пула БЦ-а мешали са четири волумена 0,83% NH_4Cl . После лаганог мешања у трајању 10-15 минута, док није наступила хемолиза еритроцита, на амбијенталној температури (18-22 °C), смешу смо центрифуговали, употребом центрифуге "Cryofuge 6 000" и ("Heraeus Instruments GmbH", Osterode, Немачка). Овај поступак пречишћавања леукоцита из пулова КСБЦ-а понављали смо два пута за сваку испитивану серију КСБЦ-а. После центрифуговања супернатант смо одбацивали (садржао је лизирани еритроцити и адхерентне беланчевине плазме). За ресуспендовање леукоцита из КСБЦ-а користили смо око 200 ml минималног есенцијалног медијума (MEM-а). Овако добијену пречишћену суспензију леукоцита уливали смо у стаклене балоне у којима се налазила подлога која је била истог састава за продукцију $\text{hIFN-}\gamma$. Ту подлогу сачињавао је: "MEM", "а-гама серум", "priming IFN-a "; као и магнет за успостављање магнетног поља и мешање ове смеше.

За КСБЦ коришћен је модификовани "Cantell-ов" метод за продукцију $\text{hIFN-}\gamma$ који је раније редовно примењиван у "Одсеку за производњу интерферона Института за имунологију и вирусологију - Торлак". Након два сата мешања у пречишћену суспензију леукоцита контролне серије убациван је "Sendai" вирус (ради индукције $\text{hIFN-}\gamma$). Индукција је трајала 18 сати уз перманентно мешање у воденом купатилу на температури од 37 °C). После завршене индукције смеша је центрифугована при брзини од 3 000 x g, у трајању од четрдесет минута и добијен је сирови $\text{hIFN-}\gamma$ у супернатанту (у талогу је остала иницијална леукоцитна суспензија). У следећу фазу обраде, односно пречишћавања (пурификацији) сировог $\text{hIFN-}\gamma$ ишло се са количином од преко пет литара сировог $\text{hIFN-}\gamma$. Пречишћавање сировог $\text{hIFN-}\gamma$ вршено је применом хемијског метода уз употребу пето моларног раствора калијум тиоцијаната

(**5M KSCN**), једнонормалног раствора хлороводоничне киселине (**1N HCl**) и 0,1-но нормалног раствора натријум хидроксида (**0,1 N NaOH**), тако да се снизи вредност pH са почетне вредности од 7,3 на 3,8. Издвојени **hIFN- γ** таложен је центрифуговањем при брзини од 2 200 x g, 40 минута на 0 °C и растваран је у фосфатном пуферу ("PBS"-у) и то у количини "PBS"-а педесет пута мањој од почетне количине сировог **hIFN- γ** . Тиме је добијен за 50% концентрованији **hIFN- γ** од онога који се налазио у сировом **hIFN- γ** . За све време извођења модификованог "Cantell-овог" метода вршено је мерење вредности pH, горе споменутих смеша, уз употребу pH-метра "HI 9017 Microprocessor" ("Hanna Instruments", Ronchi di Villafranca, Италија).

Суспензију леукоцита **ЕСБЦ-I** и **ЕСБЦ-II** која је остајала у талогу након диферентног центрифуговања користили смо за биотехнолошки поступак продукције **hIFN- γ** . Из 16 јединица **ЕСБЦ** добијали смо око 1 000 ml "пречишћене" суспензије леукоцита која је садржала око 170×10^6 леукоцита (без "контаминације" еритроцита). Овако пречишћену суспензију леукоцита добијену из **ЕСБЦ-I** и **ЕСБЦ-II**, "ресуспендовали" (растворили) смо у **MEM**-у (обогаћеном хуманим албуминима, на температури од +36 °C). За индукцију **hIFN- γ** користили смо подлогу (849 ml **MEM**-а вредности pH од 7,35; 50 ml **A-гама** (γ) серума - 20 mg/ml). У овако припремљену подлогу додавали смо ресуспендовану пречишћену суспензију леукоцита експерименталних серија (**ЕСБЦ-I** и **ЕСБЦ-II**). Подлогу смо третирали са "лиофилизованим фитохемаглутинином" - **ПХА-II** као индуктором синтезе за **hIFN- γ** (производио га је "ИНЕП" – Земун). Леофилизовани фитохемаглутинин (50 mg суве материје) растварали смо у 5 ml "редестиловане" воде и додавали га у количини од 1 ml или 10 μ g/ml). Индукција **hIFN- γ** трајала је 48 сати на +37 °C и 24 сата на +40 °C, уз перманентно мешање на магнетној мешалици у воденом купатилу. Након завршене индукције **hIFN- γ** , смесу смо центрифуговали (40 минута на 4 000 x g, при температури од +4 °C). Овим поступком добијали смо око 1 000 ml "сировог" **hIFN- γ** . Даљу концентрацију "сировог" **hIFN- γ** вршили смо центрифуговањем (5 000 обртаја, 60 минута на температури од +40 °C).

Од неопходних лабораторијских испитивања пратили смо број леукоцита и диференцијацију ћелија леукоцитне лозе. При томе, посебно смо анализирали апсолутни број неутрофила. Сва ова лабораторијска испитивања вршили смо у јединицама целе крви (ЈЦК), јединицама БЦ-а, пуловима КСБЦ и **ЕСБЦ-I** и **ЕСБЦ-II**, као и у

суспензијама леукоцита за индукцију, помоћу аутоматизованог апарата за проточну цитометрију ("Technicon H-1 System"). Вредности рН одређивали смо према Astrup-овој методи на рН-метру "HI 9017 Microprocessor" ("Hanna Instruments, Ronchi di Villafranca", Италија). У поменутих хемопродуктима испивали смо и вијабилност леукоцита, методом бојења препарата трипан плавим и бројањем "живих" ("вијабилних") леукоцита у "Spenser"-овој комори. Испитивали смо и стерилност "сирових" и "финалних" препарата hIFN- γ . Контролисали смо и "токсичност" финалних препарата, реакцијом на тиогликолату и одређивањем присуства "ендотоксина" (као резултат анаеробног бактеријског загађења). Испитивали смо методом електрофорезе присуство hIFN- γ и степен чистоће (садржај укупних протеина) у "пурификованим" препаратима hIFN- γ , а према постојећим стандардима.

Испитивали смо квалитет препарата hIFN- γ , које смо припремали из преочишћених суспензија леуковита КСБЦ, ЕСБЦ-I и ЕСБЦ-II, одређивањем антивирусне активности hIFN- γ у континуираној хомологној култури ткива хуманог амниона ("WISH") уз употребу "VSV" вируса као индуктора цитопатогеног ефекта (ЦПЕ). Испитивали смо квалитета hIFN- γ према стандардима SZO, а користили смо и "антивирусни есеј редукције цитопатогеног ефекта хуманих интерферона" одобрен од "National Institute for biological standards and control, Division of Immunobiology", Лондон, Велика Британија).

Проверавали смо и квалитет hIFN- γ добијеног из суспензија леукоцита КСБЦ и ЕСБЦ, тестирањем антићелијске активности за hIFN- γ на хомологној култури туморског ткива грлића материце - "HELLA". Том методом смо испитивали антивирусно дејство hIFN- γ (тима смо анализирали степен "уништених" ћелије малигног порекла у одређеном разблажењу). На основу тога смо израчунавали број интернационалних јединица - IU произведеног hIFN- γ). Антићелијску активност за hIFN- γ проверавали смо и на култури "WISH"-а (једнослојно ткиво – "monolaj" старости 24 сата). Овде смо употребљен "VSV" вирус као индуктор цитопатогеног ефекта (ЦПЕ), према "*Европској фармакопеји*" (пето издање-2004) (105).

Важно је нагласити да смо добијене узорке препата hIFN- γ , након индукције одговарајућим индуктором, одлагали у дип-фризу на -60°C и 1 сат пре испитивања антићелијске и антивирусне активности одмрзавали на температури од $+4^{\circ}\text{C}$. Тиме смо доказали постојаност препарата hIFN- γ на ниским температурама без губитка својих биолошких својстава, за разлику од рекомбинантних интерфе-

рона где је замрзавање забрањено и посебно истакнуто на *"Упутству о употреби rIFN- γ "* (101-5).

Антићелијска активност контролисали смо у микроплочама у којима смо разливали ћелије трипсинизованог ткива **"Hella"**. Тако припремљене микроплоче стављали смо у инкубатор са 5% CO₂. После 24 сата формирано је комплетно једно-слојно ткиво ("monolaj") без икаквих промена на ћелијама и без шупљина у ткиву. То је био знак комплетности ткива и главни је предуслов да се титрација може извести. Титрацију на некомплетном ткиву, као и на ткиву које је старије од 24 сата, нисмо изводили јер не дају поуздане резултате и они се не могу сматрати валидним.

Прорачун **"LD₅₀ титра"** за hIFN- γ анализирали смо по **"Karber"**-овом методу, уз употребу **"Reed-Muench"** формуле.

Квантитативна статистичка анализа је спроведена на рачунару. За уписивање, груписање, табеларно и графичко приказивање података коришћен је **"Excel програм из Microsoft Office 2003 програмског пакета"**. Прорачуни су вршени коришћењем **"SPSS програма у верзији 15.0"**. У свим анализама је као граница статистичке значајности подразумевана је грешка процењена од 0,05 или 5%.

Приказивани су следећи статистички параметри: **аритметичка средина ($\bar{X}$)**, **стандардна девијација (SD)**, као и **процентуални однос (%)**. Поређење средњих вредности нумеричких обележја између две групе испитаника вршено је **"Студентовим t-testom"**, а између три групе испитаника **"анализом варијансе" ("ANOVA")** и следбеним **"Тукијевим тестом" ("Tukey post hoc test")**.

6. ЗНАЧАЈ ИСТРАЖИВАЊА

Ова докторска дисертација има у основи двоструки значај, **фундаментални и практични**. **Фундаменталним значајем** указује на **вијабилности** леукоцита, односно на њихову **способности** да под **утицајем** вируса **производе** hIFN- γ у новим предложеним условима. Самим тим добио би се **повећан** принос хуманих леукоцита који би **послужио** као **јединствена** сировина за **производњу** већих количина hIFN- γ . **Практични значај** реализације ове дисертације је у **обједињавању** БЦ-а као нус-продукта из свих **трансфузиолошких** центара РСрбије, који се баве **прикупљањем** и **прерадом** крви од **добровољних** давалаца. Тиме би се **произвеле** **довољне** количине hIFN- γ које би **задовољиле** **потребе** пацијената у РСрбији, а **вишкови** hIFN- γ **могли** би се **извозити** у **земље** са **мањим** **финансијским** **могућностима**.

Поред ова два основна значајна елемента реализације докторске дисертације, **значај истраживања** везан за **испитивање** **предности** **употребе** **биотехнолошког** поступка **продукције** hIFN- γ из **пречишћене** **суспензије** хуманих леукоцита, **огледа** се и у следећем:

1. Допринос научним сазнањима о **могућностима** **увођења** **нових** **поступака** у **припремању** и **складиштењу** **јединица** БЦ-а, чиме би се **постигла** **боља** **вијабилност** и **индукциона** **способност**, као и **већи** **принос** хуманих леукоцита **намењених** за **продукцију** hIFN- γ из **пречишћене** **суспензије** леукоцита, а **самим** **тим** би се **модификованим** **биотехнолошким** **поступком** **добиле** **веће** **количине** hIFN- γ .
2. Примени **раствора** **10%** **декстрана** и **6%** **хидроксиетилног** **скроба** **високе** **молекулске** **масе**, као **руло-формирајућих** **агенаса** за **еритроците**, **омогућава** се њихова **брза** **седиментација**, а **тиме** се **отклања** **највећи** **броја** **еритроцита** у **пречишћеној** **суспензији** леукоцита и **смањује** се **садржај** **адхерентних** **серумских** **протеина**. Тиме се **добива** **пречишћенија** **суспензија** леукоцита за **продукцију** hIFN- γ .
3. **Производњи** **јефтинијих** и **квалитетнијих** **финалних** **препарата** hIFN- γ .
4. **Уштеда** у **потрошњи** **крви** због **све** **мањег** **броја** **добровољних** **давалаца**.

5. **Коришћењем хуманих леукоцита као нус-продукта из крви који се, процедуром делеукоцитирања, као "штетни" одбацују из јединица целе крви због потенцијалне опасности од посттрансфузијских реакција.**
6. **Могућност увођења модификованог биотехнолошког поступака производње hIFN- γ из пречишћене суспензије хуманих леукоцита у свакодневну производњу фармацеутске индустрије РСрбије.**

7. РЕЗУЛТАТИ

Табела 5. Испитиван број леукоцита у јединицама целе крви, контролним и експерименталним серијама buffy coat-а, као и у buffy coat-у после припреме и после складиштења

Апсолутни број ($\times 10^9$) и % Ле							
	ЛЦК (N=128)		БЦ после припреме (N=128)		БЦ после складиштења (N=128)		ANOVA
	$\bar{X} \pm SD$	(%)	$\bar{X} \pm SD$	(%)	$\bar{X} \pm SD$	(%)	
ЕСБЦ-I	$2,479 \pm 0,284^{BB***}$	100,00	$2,261 \pm 0,252^{B***}$	91,27	$1,998 \pm 0,237^{B***}$	80,61	F=111,32***
ЕСБЦ-II	$2,464 \pm 0,280^{BB***}$	100,00	$2,265 \pm 0,256^{B***}$	91,93	$2,003 \pm 0,227^{B***}$	81,33	F=105,09***
КСБЦ	$2,476 \pm 0,280^{BB***}$	100,00	$2,247 \pm 0,255^{B***}$	90,76	$1,821 \pm 0,210$	73,57	F=226,48***
ANOVA	F=0,10		F=0,17		F=27,22***		

Легенда:

v – vs КСБЦ (највећа одступања средњих вредности броја леукоцита у контролној серији);
 B – vs БЦ после припреме (највећа одступања средњих вредности броја леукоцита у БЦ-у после припреме);
 BB – vs БЦ после складиштења (највећа одступања средњих вредности броја леукоцита у БЦ-у после складиштења);

*** – $p < 0,001$ (високо статистички значајна разлика апсолунтог броја леукоцита).

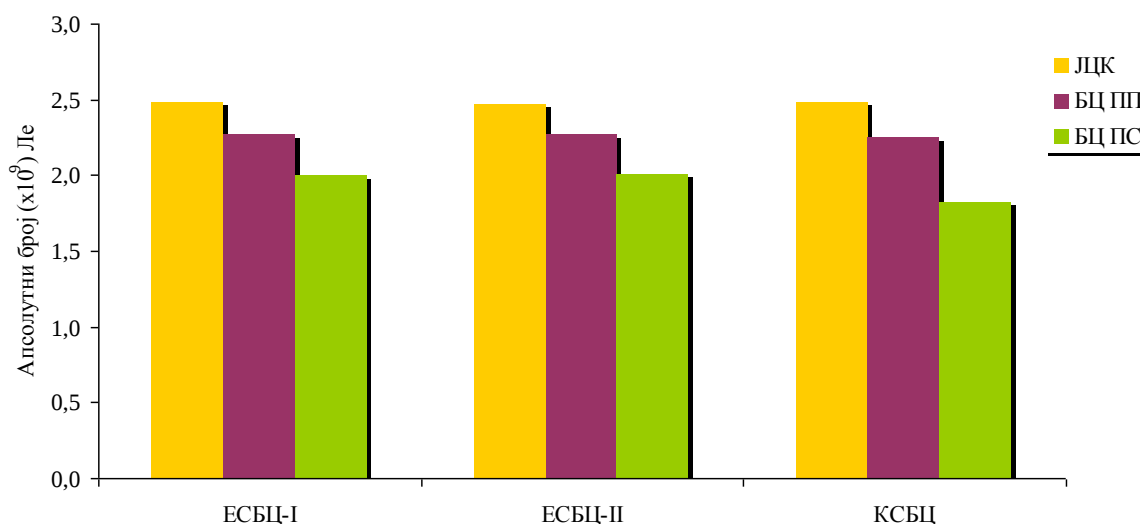
"ANOVA анализа" није утврдила постојање статистички значајних разлика апсолутних бројева леукоцита између испитивних група из јединица целе крви, као и јединица БЦ после припреме. Утврђена је високо статистички значајна разлика апсолунтог броја леукоцита из јединица БЦ после складиштења између испитиваних група на нивоу од $p < 0,001$.

Следственом "Post Hoc" анализом, "Tukey"- овим тестом, утврђено је да је апсолутни број леукоцита у јединицама БЦ после складиштења статистички значајно већи у експерименталним групама ЕСБЦ-I и ЕСБЦ-II у односу на контролну групу, уз максимални ниво статистичке значајности ($p < 0,001$).

Из резултата приказаних у табели 5 запажа се да је у свим испитиваним јединицама БЦ-а издвојен отприлике исти процентуални однос леукоцита у односу на почетне вредности у ЈЦК (ЕСБЦ-I - 91,27%; ЕСБЦ-II – 91,93% и КСБВ – 90,76%). Истовремено се може уочити да је током складиштења број леукоцита смањен за око 19 до 20% у јединицама БЦ-а (ЕСБЦ- I - $1,998 \pm 0,237$ и ЕСБЦ- II - $2,003 \pm 0,227$) складиштеним у инкубатору на константној температури од $+22^{\circ}\text{C}$ уз перманентно хоризонтално трешење (80 обртаја/минут), а знатно више (око 27%) у БЦ-у складиштеном на амбијенталној температури (КСБЦ - $1,821 \pm 0,210$).

Статистичком обрадом резултата у испитивању просечног броја леукоцита у ЈЦК, БЦ-у после припреме и БЦ-у после складиштења, утврђено је да постоје високо значајне разлике ($p < 0,001$) у просечном броју Ле у ЈЦК и броју Ле у БЦ-у после складиштења између група ЕСБЦ-I и КСБЦ, као и ЕСБЦ-II и КСБЦ (табела 5).

Када у оквиру појединих испитиваних серија БЦ-а упоређујемо статистичке разлике вредности Ле уочавамо да су статистички значајне разлике средњих вредности Ле (на нивоу $p < 0,001$) између ЈЦК и БЦ-а после припреме, ЈЦК и БЦ-а после складиштења, као и између БЦ-а после припреме и БЦ-а после складиштења, а и у оквиру сваке испитане серије понаособ. Ово се дешава првенствено због тога што су средње вредности Ле у свим испитаним серијама значајно веће у ЈЦК у односу на БЦ после припреме и БЦ после складиштења и зато што је просечно издвојено мање леукоцита у БЦ-а после припреме (за око 8-9%), а знатно мање Ле је издвојено БЦ после складиштења у испитиваним серијама (око 18,7-26,5%).



Графикон 1. Средње вредности броја леукоцита у јединици целе крви, buffy coat-у после припреме и buffy coat-у после складиштења

На **графикону 1**, у виду **стубичастог дијаграма (хистограма)** приказане су средње вредности броја леукоцита у јединицама целе крви, "buffy coat"-у после припреме и "buffy coat"-у после складиштења за све испитиване серије.

Табела 6. Испитиван је апсолутни број и процентуални (%) однос леукоцита у пуловима buffy coat-а испитиваних серија и у пречишћеним суспензијама леукоцита

Апсолутни број (× 10 ⁹) и % Ле						
У пулу после седиментације Ер (N=8)			У пречишћеној суспензији Ле (N=8)			
	$\bar{X} \pm SD$	(%)		$\bar{X} \pm SD$	(%)	t-тест
ЕСБЦ-I	14,735 ± 1,506 ^{B**}	100,00		13,890 ± 1,463 ^{B**}	94,27	t=1,139
ЕСБЦ-II	15,772 ± 1,179 ^{B***}	100,00		15,200 ± 0,964 ^{B***}	96,47	t=1,062
КСБЦ	12,493 ± 1,065	100,00		11,572 ± 0,963	92,68	t=1,813
ANOVA	F=14,07 ^{***}			F=20,26 ^{***}		

Легенда:

в – vs КСБЦ (највећа одступања средњих вредности броја леукоцита у контролној серији пречишћене суспензије леукоцита);

** – $p < 0,01$ (статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$);

*** – $p < 0,001$ (статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,001$).

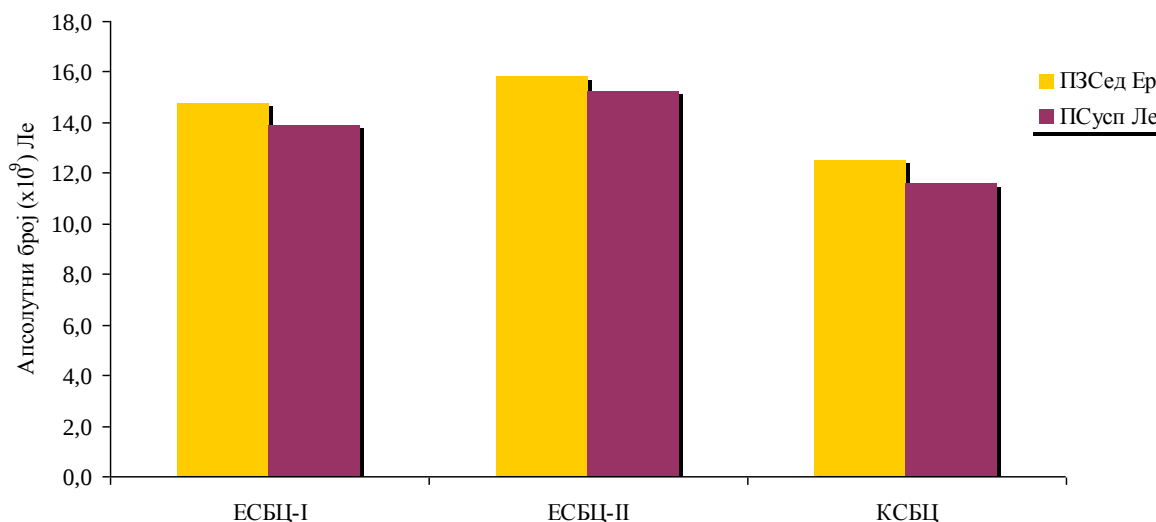
"ANOVA анализа" је утврдила постојање статистички значајне разлике апсолутног броја леукоцита између испитивних група у пулу после седиментације Ер, као и у пречишћеној суспензији Ле на нивоу од $p < 0,001$.

Следственом "Post Hoc анализом", "Tukey"- овим тестом, утврђено је да је апсолутни број леукоцита у пулу после седиментације Ер, као и у пречишћеној суспензији Ле, у односу на контролну групу статистички значајно већи у експерименталним групама ЕСБЦ-I ($p < 0,01$) и ЕСБЦ-II ($p < 0,001$).

Апсолутни број леукоцита и средње вредности леукоцита издвојених у пречишћеним суспензијама леукоцита, у односу на укупни број Ле у испитиваним пуловима БЦ-а (сваки пул је садржао 8 јединица БЦ) после седиментације Ер међусобно се знатно разликује (табела 6). На основу ових анализа дошло се до сазнања да је **највећа средња вредност укупног броја Ле после седиментације Ер са**

6% хидрокси етилним скробом у пулу ЕСБЦ-II ($15,200 \pm 0,964$). Нешто је **нижа** средње вредности укупног броја Ле у пулу ЕСБЦ-I ($13,890 \pm 1,463$) где је као руло-формирајући агенс коришћен 10% декстран високе молекулске масе, док је **најнижа** средња вредност укупног броја Ле у пулу КСБЦ ($11,572 \pm 0,963$) где је по дотадашњој устаљеној биотехнолошкој процедури коришћен за лизирање еритроцита раствор 0,83% NH_4Cl . Из пула ЕСБЦ-I просечно је издвојено у пречишћену суспензију леукоцита **око 94,27% Ле** из иницијалних пулова БЦ-а после седиментације Ер, док је **нешто више Ле (96,47%)** издвојено из пула ЕСБЦ-II после завршене седиментације еритроцита са 6% раствором хидрокси етилног скроба у пречишћеној суспензији Ле, док је у КСБЦ групи издвојено **92,68%**.

Статистичком обрадом, "Студентовим t-тестом", средњих вредности леукоцита у пуловима buffy coat-а после седиментације еритроцита и у пречишћеној суспензији леукоцита приказаних у табели 6, утврђено је да су вредности ниже у пречишћеној суспензији, али без статистички значајне разлике у односу на пулове после седиментације еритроцита.



Графикон 2. Средње вредности леукоцита у пуловима buffy coat-а после завршене седиментације еритроцита и у пречишћеним суспензијама леукоцита

У току наше студије испитивали смо и апсолутни број и процентуални (%) однос неутрофила у пуловима buffy coat-а испитиваних серија и у пречишћеним суспензијама леукоцита (табела 7).

Табела 7. Испитиван је апсолутни број и процентуални (%) однос неутрофила у пуловима buffy coat-а испитиваних серија и у пречишћеним суспензијама леукоцита

Апсолутни број ($\times 10^9$) и % неутрофила						
	ЛЦК (N=128)		БЦ после припреме (N=128)		БЦ после складиштења (N=128)	
	$\bar{X} \pm SD$	(%)	$\bar{X} \pm SD$	(%)	$\bar{X} \pm SD$	(%)
ЕСБЦ-I	$1,622 \pm 0,282^{B*B***}$	100,00	$1,540 \pm 0,269^{B*}$	94,95	$1,497 \pm 0,260^{B***}$	92,33
ЕСБЦ-II	$1,630 \pm 0,302^{B***}$	100,00	$1,595 \pm 0,294^{B***}$	97,87	$1,522 \pm 0,283^{B***}$	93,34
КСБЦ	$1,611 \pm 0,297^{B*B***}$	100,00	$1,443 \pm 0,265^{B*}$	89,60	$1,357 \pm 0,254$	84,25
ANOVA	F=0,14		F=9,97***		F=14,24***	

Легенда:

в – vs КСБЦ (највећа одступања средњих вредности броја неутрофила у контролној серији);

Б – vs БЦ после припреме (највећа одступања средњих вредности броја неутрофила у БЦ-у после припреме);

В – vs БЦ после складиштења (највећа одступања средњих вредности броја неутрофила у БЦ-у после складиштења);

* – $p < 0,05$ (статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$);

*** – $p < 0,001$ (статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,001$).

"ANOVA анализа" није утврдила постојање статистички значајних разлика апсолутних бројева неутрофила између испитивних група из јединица целе крви. Међутим, између испитиваних група утврђена је високо статистички значајна разлика апсолутног броја неутрофила из јединица БЦ после припреме, као и јединица БЦ после складиштења на нивоу од $p < 0,001$.

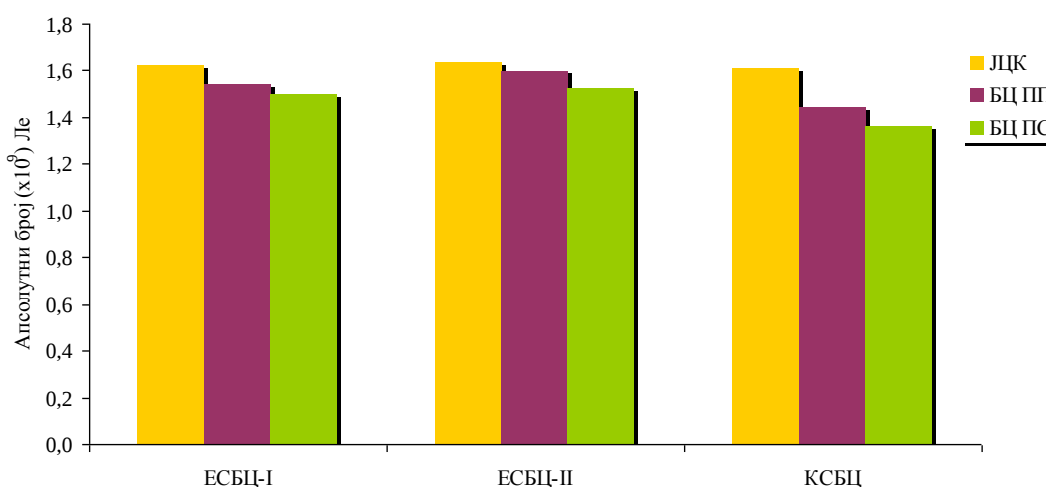
Следственом "Post Hoc анализом", "Tukey" - овим тестом, утврђено је да је апсолутни број неутрофила у јединицама после припреме БЦ статистички значајно већи у односу на контролну групу, у групи ЕСБЦ-I на нивоу статистичке значајности од $p < 0,05$, а у групи ЕСБЦ-II на нивоу статистичке значајности од $p < 0,001$. Вредности апсолутног броја неутрофила у БЦ после складиштења статистички значајно су већи у експерименталним

групама ЕСБЦ-I ($1,497 \pm 0,260$) и ЕСБЦ-II ($1,522 \pm 0,283$) у односу на контролну групу ($1,357 \pm 0,254$), уз максимални ниво статистичке значајности ($p < 0,001$).

У табели 7 приказали смо резултате апсолутног броја неутрофила КСБЦ, ЕСБЦ-I и ЕСБЦ-II у ЈЦК, после припреме и после складиштења из којих смо закључили да су средње вредности апсолутног броја неутрофила у ЈЦК за све три испитиване серије приближно исте (око $1,6 \times 10^9$). После припреме у ЕСБЦ-II просечно је издвојено 97,87% тих неутрофила из ЈЦК, у јединици БЦ-а из ЕСБЦ-I просечно је издвојено 94,95% неутрофила из иницијалних ЈЦК, а у јединици БЦ-а из КСБЦ издвојено је знатно мање неутрофила (89,60%) у односу на експерименталне серије. Даљом анализом резултата из табеле 7 запазили смо да је током складиштења број неутрофила смањен у свим испитиваним серијама, у односу на почетне вредности: за 7,67% у ЕСБЦ-I; 6,66% у ЕСБЦ-II, а чак преко 15,75% у КСБЦ.

Анализом резултата средњих вредности неутрофила, у оквиру појединих испитиваних серија, евидентно је да су највеће вредности у ЈЦК ($\sim 1,6 \times 10^9$), ниже су у БЦ после припреме ($\sim 1,5 \times 10^9$), а најниже у БЦ после складиштења (ЕСБЦ-I = $1,497 \pm 0,260$; ЕСБЦ-II = $1,522 \pm 0,283$; КСБЦ = $11,572 \pm 0,963$). "Студентовим t-тестом" је утврђено да су вредности апсолутног броја неутрофила статистички значајно веће у ЈЦК но у БЦ после складиштења, на нивоу $p < 0,001$. У групи ЕСБЦ-I апсолутни број неутрофила већи је и у односу на БЦ после припреме на статистичке значајности од $p < 0,05$, а слично је и у контролној групи, али уз максимални ниво статистичке значајности од $p < 0,001$.

Средње вредности неутрофила у ЈЦК и пуловима испитиваних серија БЦ-а приказане су стубичастим дијаграмом (хистограмом) на графикону 3.



Графикон 3. Средње вредностима апсолутног броја неутрофила у ЈЦК и пуловима испитиваних серија БЦ-а после припреме и после складиштења

Табела 8. Анализа апсолутног просечног броја неутрофила у пуловима суспензија леукоцита-buffy coat-а испитаних серија после седиментације еритроцита и у пречишћеним суспензијама леукоцита

Апсолутни број ($\times 10^9$) и % неутрофила					
У пулу после седиментације Ер (N=8)			У пречишћеној суспензији Ле (N=8)		
	$\bar{X} \pm SD$	(%)	$\bar{X} \pm SD$	(%)	t-тест
ЕСБЦ-I	$1,495 \pm 0,120^{B***}$	100,00	$1,392 \pm 0,109^{B***}$	93,11	t=1,803
ЕСБЦ-II	$1,513 \pm 0,113^{B***}$	100,00	$1,423 \pm 0,105^{B***}$	94,04	t=1,656
КСБЦ	$1,186 \pm 0,141$	100,00	$1,141 \pm 0,133$	96,29	t=0,649
ANOVA	F=17,32 ^{***}		F=20,26 ^{***}		

B – vs КСБЦ

** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$

"ANOVA анализа" је утврдила постојање статистички значајних разлика апсолутних бројева неутрофила између испитивних група у пулу после седиментације еритроцита и у пречишћеној суспензији леукоцита на нивоу од $p < 0,001$.

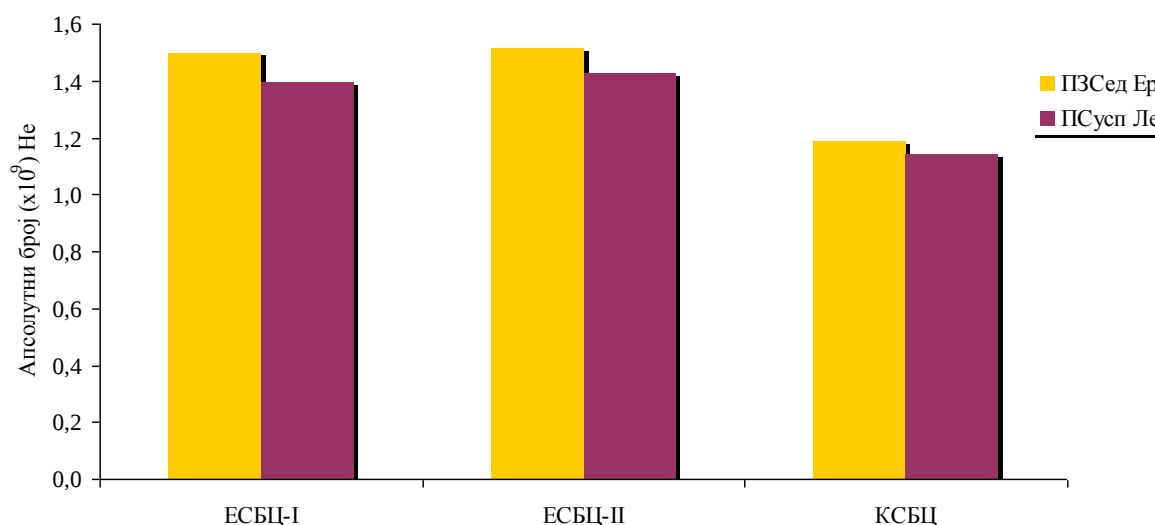
Следствена "Post Hoc анализом", "Tukey" - овим тестом, утврдила је да је апсолутни број неутрофила у пулу после седиментације еритроцита, као и у пречишћеној суспензији леукоцита, у односу на контролну групу статистички значајно већи у обе експерименталне групе понаособ са максималним нивоом статистичке значајности ($p < 0,001$).

Анализирали смо апсолутни просечан број неутрофила у пуловима суспензија БЦ-а испитаних серија после седиментације еритроцита и у пречишћеним суспензијама леукоцита. Уочили смо да је просечан број неутрофила мањи у пречишћеној суспензији леукоцита него у пулу после седиментације еритроцита. Из овога смо закључили да су највеће средње вредности укупног броја неутрофила после седиментације Ер у пулу ЕСБЦ-II ($1,513 \pm 0,113$), нешто ниже су средње вредности укупног броја неутрофила у пулу ЕСБЦ-I ($1,495 \pm 0,120$), док су најниже средње вредности укупног броја неутрофила у пулу КСБЦ ($1,186 \pm 0,141$).

У оквиру испитиваних пулова БЦ-а не постоје статистички значајне разлике у апсолутном броју неутрофила између пулова после седиментације Ер и пулова у пречишћеној суспензији Ле.

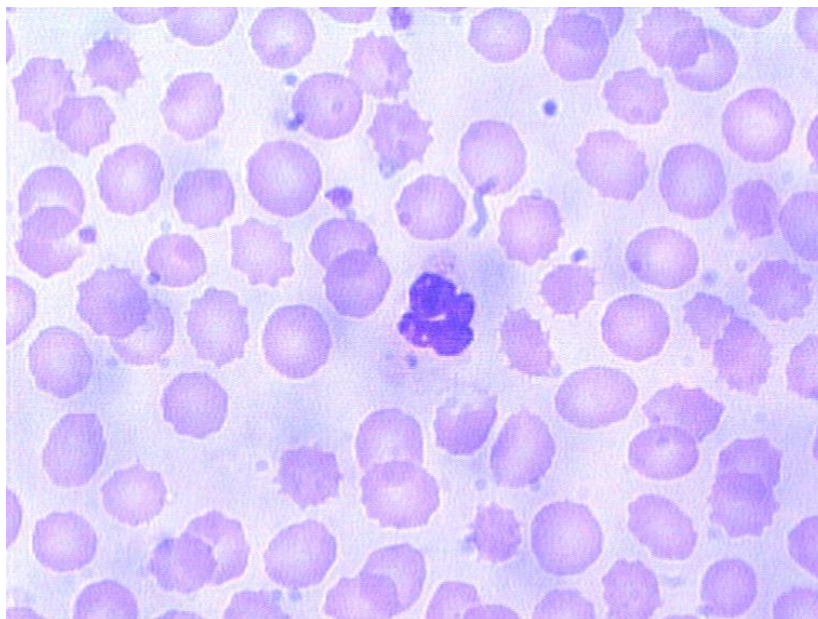
Просечно је издвојено **93,11% неутрофила у пречишћеној суспензији Ле** у групи ЕСБЦ-I ($1,392 \pm 0,109$); **94,04% у групи ЕСБЦ-II** ($1,423 \pm 0,105$); док је нешто више неутрофила (**96,29%**) издвојено из пула КСБЦ у пречишћеној суспензији леукоцита ($1,141 \pm 0,133$).

Средње вредности неутрофила у испитиваним пуловима БЦ-а после завршене седиментације еритроцита и у пречишћеним суспензијама леукоцита приказане су на графикону 4.



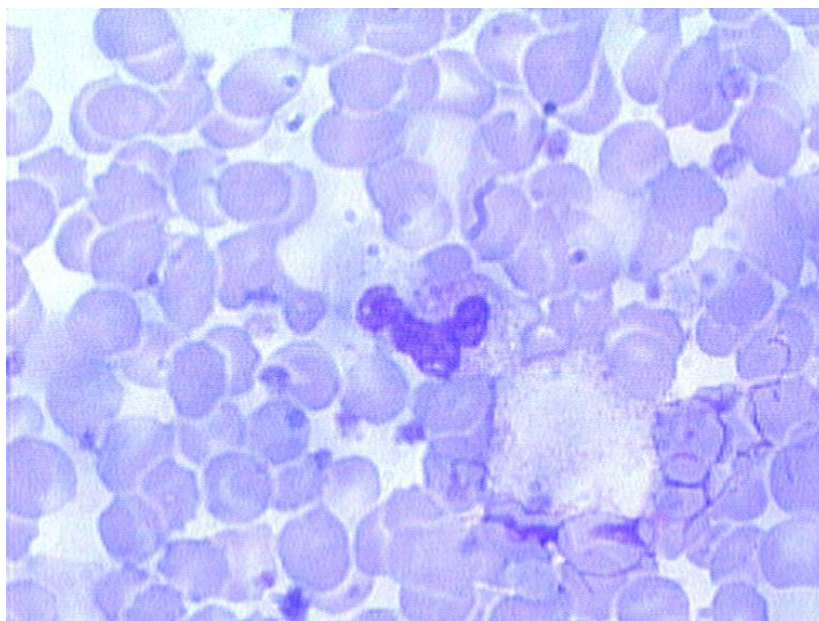
Графикон 4. Средње вредности неутрофила у пуловима суспензије леукоцита - buffy coat после завршене седиментације еритроцита и у пречишћеним суспензијама леукоцита

Из узорак испитиваних серија БЦ-а анализирали смо морфологију леукоцита посматрањем крвних размаза које смо бојили по методи "May-Grinwald-Giemsa". Због значаја неутрофила у продукцији hIFN- γ из исте леукоцитне суспензије, пратили смо промену морфологије неутрофила. Посматрањем крвних размаза из ЈЦК и узорак из испитиваних серија БЦ-а после припреме уочили смо промене на крвним ћелијама. Неутрофили су у припремљеном БЦ-у у односу на неутрофиле из ЈЦК непромењене морфологије. Када смо посматрали морфологију неутрофила у каснијим фазама испитивања закључили смо да је изражена базофилија цитоплазме неутрофила и у свим испитиваним серијама цитоплазма неутрофила се јаче боји. У свим испитиваним серијама цитоплазма неутрофила показује изразиту базофилију.



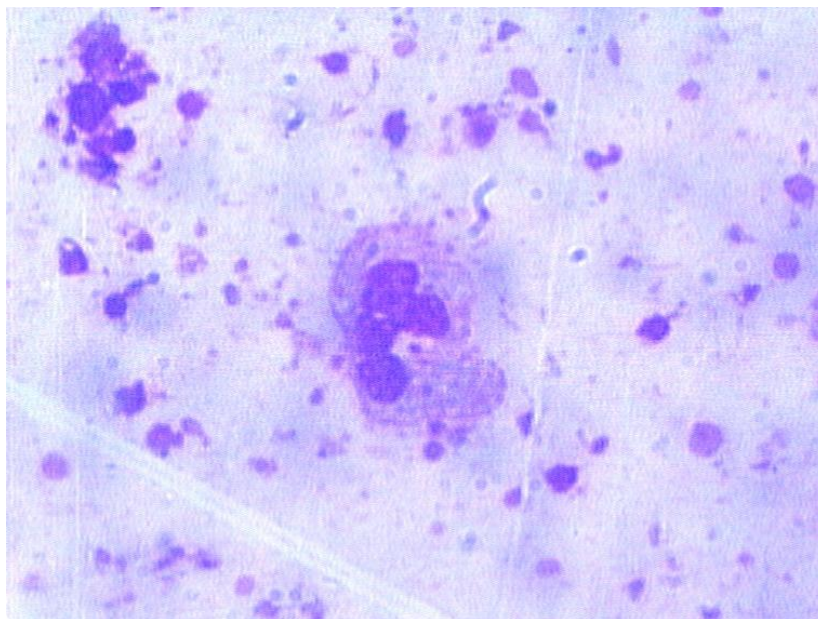
Слика 9. Изглед неутрофила у крвном размазу из јединице целе крви

У размазу периферне крви (из узорка целе крви) није запажена промена морфологије неутрофила, нити промена у обојености цитоплазма неутрофила нормално је пребојена (слика 9).



Слика 10. Неутрофили у крвном размазу из БЦ-а после припреме

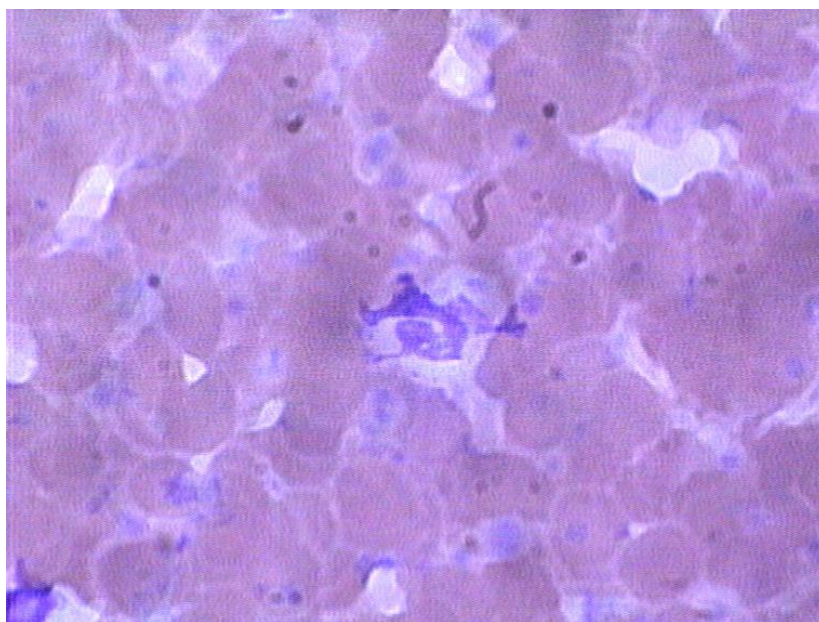
У крвном размазу из узорка БЦ (све три испитиване серије после припреме), нисмо запазили неке битније промене у морфологији и грађи неутрофила у односу на целу крв. Неутрофили у БЦ-у после припреме непромењене су морфологије, једро им је неизмењено а цитоплазма је нормално пребојена и није оштро ограничена (слика 10).



Слика 11. Изглед неутрофила у крвном размазу из БЦ-а после складиштења ЕСБЦ-I

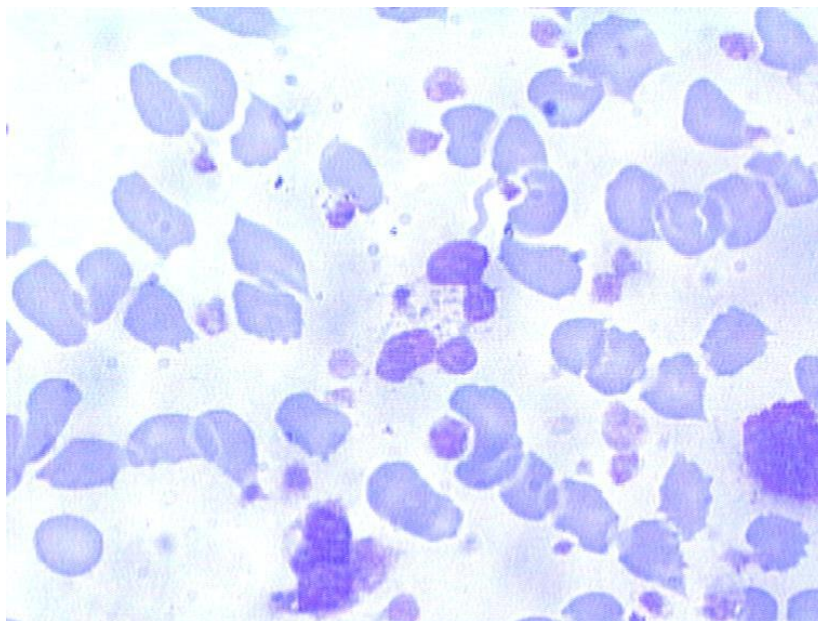
У размазу периферне крви из узорка БЦ-а после складиштења ЕСБЦ-I, запазили смо нешто веће неутрофиле, у односу на неутрофиле из целе крви. Неутрофили се слабије боје, док с једро, цитоплазма и структуре хроматина готово збрисане (нису јасно изражене) (слика 11).

Посматрајући периферне размаз крви бојен методом "May-Grinwald-Giemsa" из узорка БЦ-а после складиштења ЕСБЦ-II запазили смо да су неутрофили неизмењене величине и грађе у односу на иницијалну ЈЦК из које је припремљена.



Слика 12. Неутрофили у крвном размазу из БЦ-а после складиштења ЕСБЦ- II

Једро и цитоплазма неутрофила из БЦ-а после складиштења слабије се боје, а цитоплазма је нејасно ограничена (слика 12).



Слика 13. Изглед неутрофила у крвном размазу узетом из КСБЦ

Уочили смо потпуно измењену морфологију неутрофила у размазу периферне крви из КСБЦ. У центру препарата запазили смо дегенеративно измањен неутрофил, са распаднутим једром, нејасно ограниченом цитоплазмом која је изразито базифилно пребојена (слика 13).

Анализирали смо вијабилност Ле у испитиваним хемопродуктима методом бојења препарата трипан плавим и бројањем живих (вијабилних) леукоцита у "Spenser"-овој комори (табела 9).

Непосредно после ексфузије од добровољних давалаца анализирали смо вијабилност леукоцита у целој крви и закључили смо да је вијабилност леукоцита у целини очувана и износи 100%, за све три испитиване серије. Вијабилност леукоцита уједначена је (99%) у БЦ-у после припреме у све три испитиване серије.

Анализом вијабилности леукоцита у БЦ-у после складиштења запазили смо да је вијабилност леукоцита прилично уједначена за експерименталне серије ЕСБЦ-I и ЕСБЦ-II (98%), док је у КСБЦ после складиштења вијабилност Ле нешто нижа (96%). Испитивањем вијабилности леукоцита после завршене седиментације еритроцита у испитиваним серијама запазили смо да се вијабилност леукоцита смањује, нешто мање у експерименталним серијама ЕСБЦ-I (96%) и ЕСБЦ-II (97%),

док у КСБЦ после седиментације еритроцита изведене раствором 0,83% NH_4Cl приметили смо да је вијабилност леукоцита знатно опала на 93%.

Табела 9. Процентуални однос живих (вијабилних) леукоцита у "Spenser"-овој комори мерење вијабилности леукоцита методом бојења препарата трипан плавим

Врста хемопродукта	Вијабилност леукоцита изражена у процентуалном односу (%) живих Ле
ЈЦК после ексфузије	100%
ЕСБЦ-I после припреме	99%
ЕСБЦ-II после припреме	99%
КСБЦ после припреме	99%
ЕСБЦ-I после складиштења	98%
ЕСБЦ-II после складиштења	98%
КСБЦ после складиштења	96%
ЕСБЦ-I после седиментације Ер	96%
ЕСБЦ-II после седиментације Ер	97%
КСБЦ после седиментације Ер	90%
Пречишћена суспензија Ле из ЕСБЦ-I	95%
Пречишћена суспензија Ле из ЕСБЦ-II	96%
Пречишћена суспензија Ле из КСБЦ	90%

Посматрањем вијабилности леукоцита у пречишћеној суспензији леукоцита, запазили смо да се вијабилност Ле смањује тако што је нешто нижа у експерименталним серијама ЕСБЦ-I (95%) и ЕСБЦ-II (96%), док је у пречишћеној суспензији леукоцита у КСБЦ знатно нижа и пада на 90%.

У нашим испитивањима, поред осталих мерења вршили смо и мерење вредности рН у испитиваним серијама хемопродуката.

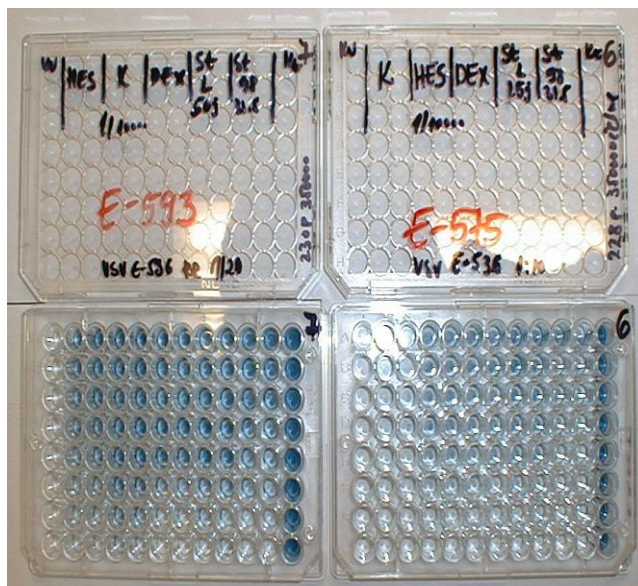
Табела 10. Анализа мерења вредности рН у испитиваним серијама хемопродуката

Врста хемопродукта	Мерење вредности рН у испитиваним серијама		
	ЕСБЦ-I	ЕСБЦ-II	КСБЦ
Јединица целе крви	7,31	7,31	7,31
БЦ после пулирања	7,26	7,55	7,35
БЦ 1 сат после додатка руло-формирајућег агенса	7,19	7,30	7,19
Пречишћена суспен-зија леукоцита	7,00	7,00	7,00

Анализом мерења вредности рН у испитиваним серијама хемопродуката (табела 10) добили смо следеће резултате:

- У целој крви за све три испитиване серије (ЕСБЦ-I, ЕСБЦ-II, КСБЦ) вредности рН биле су једнаке и износиле су 7,31;
- У пулу КСБЦ вредност рН, непосредно после пулирања, порасла је на 7,35;
- Вредност рН у пулу ЕСБЦ-I, непосредно после пулирања и додавања раствора 10% декстрана, износила је 7,26, док је након сат времена складиштења, на амбијенталној температури и завршене седиментације Ер вредност рН у ЕСБЦ-I била 7,19;
- Вредност рН у пулу ЕСБЦ-II, непосредно после пулирања и додавања раствора 6% ХЕС-а, износила је 7,55, док је после сат времена складиштења на амбијенталној температури и завршене седиментације еритроцита, вредност рН у супернатанту била је 7,30, а у седименту ЕСБЦ-II била је 7,19;
- рН минималне есенцијалне подлоге (МЕМ) пре припреме била је 6,9, а припремљени МЕМ има најповољнији рН - 7,36;
- рН раствора 0,83% амонијум хлорида износила је 6,9;
- рН вредности суспензија Ле за све три испитиване серије БЦ-а биле су исте (7,00).

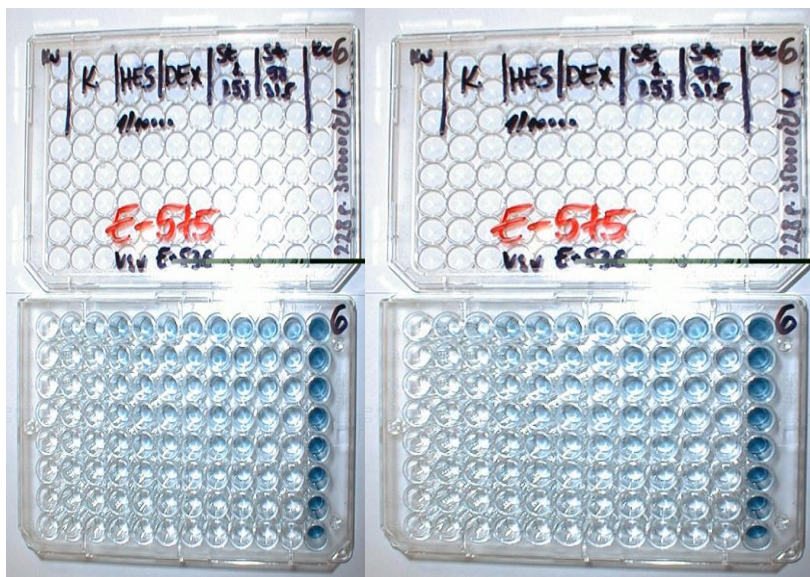
Испитивали смо и квалитет препарата hIFN- γ , које смо припремали из пре-чишћених суспензија леуковита КСБЦ, ЕСБЦ-I и ЕСБЦ-II, одређивањем антиви-русне активности hIFN- γ у континуираној хомологној култури ткива хуманог амниона ("WISH") уз употребу "VSV" вируса као индуктора цитопатогеног ефекта (ЦПЕ).



Слика 14. Микротитарске плоче са приказом цитопатогеног ефекта испитиваних серија hIFN- γ у континуираној хомологној култури ткива хуманог амниона ("WISH") уз употребу "VSV" вируса

Испитивали смо квалитета hIFN- γ према стандардима SZO, а користили смо и "антивирусни есеј редукције цитопатогеног ефекта хуманих интерферона" одобрен од "National Institute for biological standards and control, Division of Immunobiology", Лондон, Велика Британија). На слици 14 приказали смо микроотитарске плоче са приказаним цитопатогеним ефектом испитиваних серија hIFN- γ .

Испитивали смо и квалитет ИНФ- γ тако што смо одређивали антивирусну активност hIFN- γ у континуираној хомологној култури ткива хуманог амниона ("WISH") уз употребу "VSV" вируса као индуктора цитопатогеног ефекта (ЦПЕ).



Слика 15. Микротитарске плоче са приказом цитопатогеног ефекта и антићелијске активности испитиваних серија ИНФ- γ на хомологној култури туморског ткива грлића материце - "Hella" уз употребу "VSV" вируса као индуктора цитопатогеног ефекта (ЦПЕ)

Користили смо **антивирусни есеј редукције цитопатогеног ефекта хуманих интерферона** [одобрен је од "National Institute for biological standards and control, Division of Immunobiology", Лондон, Велика Британија). Тестирана је и антићелијска активности за **hIFN- γ** на хомологној култури туморског ткива грлића материце - "Hella" [према *Европској фармакопеји* - пето издање-2004 (105)] (слика 15).

Испитивањем **квалитета hIFN- γ** дошло се до резултата који су указивали да је контролна серија била негативна, односно нису нађене никакве промене на ћелијама испитиваног ткива, као и непромењен број ћелија у испитиваном ткиву. Контрола **антивирусне активности hIFN- γ добијеног из ЕСБЦ-I** показала је антивирусну заштиту "monoleja" у разблажењу 1 : 10 000 већу од 50%, а контрола антивирусне активности **hIFN- γ добијеног из ЕСБЦ-II** показала је антивирусну заштиту "monoleja" у разблажењу 1 : 5 000 већу од 50%. **Контрола антићелијске активности hIFN- γ добијеног из ЕСБЦ-I на "Hella" ткиву** показала је позитиван резултат у разблажењу 1 : 500. **Контрола антићелијске активности hIFN- γ добијеног из ЕСБЦ-II на "Hella" ткиву** показала је позитиван резултат у разблажењу 1 : 100.

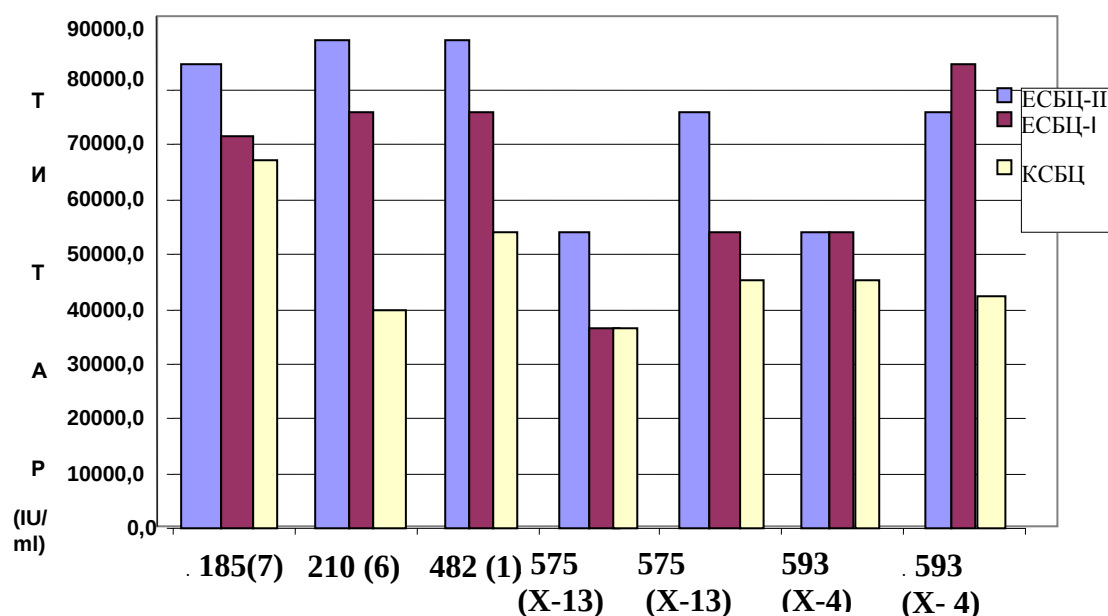
Прорачун ЛД₅₀ титра hIFN-γ радили смо по "Karber"-овом методу, уз употребу "Reed-Muench" формуле и добијене резултате средњих вредности титра титра hIFN-γ.

Табела 11. Вредности титрација узорака hIFN-γ добијене из експерименталне серије buffy coat –а - I, buffy coat–а - II и контролне серије buffycoat-a

ЕСБЦ-II	Експеримент бр.	Титар IU/ml	Стандард	Метода
	185 (7)	82000,0	WHO 69/19	Стандард
	210 (6)	85000,0	Wellcome	Стандард
	482 (1)	86000,0	Wellcome	Стандард
	575 (X - 13)	56000,0	Wellcome	NIBSC
	575 (X - 13)	77000,0	Лондон	NIBSC
	593 (X - 4)	54000,0	Wellcome	NIBSC
	593 (X - 4)	74000,0	Лондон	NIBSC
Средња вредност		73 428,57		
ЕСБЦ-I	Експеримент бр.	Титар IU/ml	Стандард	Метода
	185 (7)	71000,0	WHO 69/19	Стандард
	210 (6)	75000,0	Wellcome	Стандард
	482 (1)	76000,0	Wellcome	Стандард
	575 (X - 13)	46000,0	Wellcome	NIBSC
	575 (X - 13)	67000,0	Лондон	NIBSC
	593 (X - 4)	54000,0	Wellcome	NIBSC
	593 (X - 4)	84000,0	Лондон	NIBSC
Средња вредност		67 571,43		
КСБЦ	Експеримент бр.	Титар IU/ml	Стандард	Метода
	185 (7)	68000,0	WHO 69/19	Стандард
	210 (3)	40000,0	WHO 69/20	Стандард
	482 (1)	56000,0	Wellcome	Стандард
	575 (X - 13)	47000,0	Wellcome	NIBSC
	575 (X - 13)	43000,0	Лондон	NIBSC
	593 (X - 4)	42000,0	Wellcome	NIBSC
	593 (X - 4)	41000,0	Лондон	NIBSC
Средња вредност		48 142,86		

Из табеле 11 уочили смо да су највеће средње вредности титра hIFN- γ нађене у узорцима ЕСБЦ-II (73 428,57 IU/ml), а нешто мање средње вредности титра hIFN- γ пронађене у узорцима ЕСБЦ-I (67 571,43 IU/ml), док смо најниже средње вредности титра hIFN- γ пронашли у узорцима КСБЦ (48 142,86 IU/ml). Средње вредности титра hIFN- γ из узорка КСБЦ мање за 34,44% од средњих вредности титра hIFN- γ у узорцима ЕСБЦ-II, а за око 28,75% мање од средњих вредности титра hIFN- γ у узорцима ЕСБЦ-I.

На графикону 5 приказали смо средње вредности титрација hIFN- γ у испитиваним серијама БЦ-а.



Графикон 5. Средње вредности титрација узорка хуманог интерферона- γ добијених из експерименталне серије buffy coat -a-I, buffy coat -a-II и контролне серије buffycoat-a

Испитивали смо и стерилности свих узорка испитиваних серија сирових и финалних препарата hIFN- γ , које је вршено у "Институту за имунологију и вирусологију – Торлак". Резултати ових испитивања показали су да су резултати свих узетих узорка за испитивање стерилности били стерилни и показивали су негативну реакцију на токсичност свих испитиваних серија сирових и финалних препарата hIFN- γ . Нису откривени ни ендотоксини у испитиваним узорцима који су производ

анаеробног загађења. Сви испитивани узорци сирових и финалних препарата hIFN- γ давали су негативну реакцију на тиогликолату.

У "Одељењу за имунохемију Института за имунологију и вирусологију Торлак" испитан је степен чистоће (укупни протеини у пурификованим препаратима hIFN- γ) за све три испитиване серије и дошло се до сазнања да је иста количина укупних протеина нађена у пурификованим препаратима hIFN- α и hIFN- γ и да су средње вредности протеина истоветне за КСБЦ и ЕСБЦ-I (0,435 mg/ml), док су веће количине укупних протеина нађене у пурификованом hIFN- γ добијеном из ЕСБЦ-II (0,534 mg/ml).

8. ДИСКУСИЈА

Isaacs и Lindenmann су, средином шесте деценије двадесетог века, дошли до епохалног открића IFN-а. Од тада се IFN налази у жижи интересовања многих научника и предмет је истраживања у многим лабораторијама светски признатих истраживачких центара. На основу досадашњих испитивања у савременој медицини због својих изванредних терапијских особина, IFN многи убрајају у једно од најзначајнијих открића нашег времена. Ово епохално откриће упоређивали су са открићем пеницилина, који је имао изванредно дејство на бактерије, сматрали су да је коначно пронађено биотехнолошко средство са моћним антивирусним дејством које ће моћи да контролише и заустави размножавање вируса (44, 47, 56-9). Важно је напоменути да IFN поред антивирусног дејства, инхибиторно делује на раст онкогених вируса, па га оправдано у научним круговима називају антитуморским агенсом (57, 19-21).

Дугогодишње клиничко искуство у свету од преко пола века, потврдило је да су хумани IFN-и (hIFN-и) најприроднији биолошки препарати, најмање штетни и најмање имуногени препарати на тржишту лекова (13). Болесници су, након других третмана, изузетно ретко одговарали синтезом антитела против hIFN-γ. За IFN-γ утврђено је да његово појачано лучење, у активисаним Т-лимфоцитима, доприноси патогенези неких аутоимунних поремећаја. Тада долази до појачане експресије антигена класе II система HLA. Та претпоставка потврђена је и у експериментима. После примене егзогеног IFN-γ код експерименталних животиња запажен је пораст антитела усмерених против антигена класе II система HLA или против IFN-γ. Доказано је да не само rIFN-γ, него и неки други рекомбинантни препарати цитокина (интерлеукин-4 – IL-4, фактор некрозе тумора - TNF, фактор раста моноцитопоезе - М-ЦСФ и фактор раста грануло-моноцитопоезе - ГМ-ЦСФ) могу бити посредници појачане експресије антигена класе II система HLA (3).

Као што смо већ напоменули, IFN-γ има слабије антивирусно дејство, али испољава јаче антитуморске и имуномодулаторне ефекте у односу на IFN-α и IFN-β. IFN-γ интензивира антитуморске ефекте друга два IFN-а (3, 11, 13).

Данас се у научним круговима поклања велика пажња биотехнолошким поступцима у производњи hIFN-а. Биотехнологија користи живе организме или хумана ткива за производњу биотерапеутских једињења. Зато је биотехнологија веома важна у хуманој медицини јер у центар своје делатности поставља производњу биотехнолошких препарата. Листа биотерапеутских једињења садржи преко 500 признатих биотерапеутских продуката. На врху те листе налазе се IFN- γ - "Acstimune"® и IFN- α - "Intron A"®. Др Sidney Peteska, кога у медицини сматрају једним од твораца интерферона, добио је престижну награду (2006) за истраживања на пољу медицине. Награду му је доделила фондација "Lemelson - MIT" за животно дело и огроман допринос у биотехнологији, хроматографском пречишћавању hIFN-а у фармацеутској индустрији, као и због огромног доприноса у развоју анти-вирусног третмана хепатитиса типа Б и Ц, мултипле склерозе, канцера, као и на унапређењу здравља код многих тешких болести (75).

У протекле четири деценије, не располаже се довољним количинама препарата hIFN-а за клиничку употребу у целом свету и за експериментална истраживања. То је био основни разлог успорених клиничких испитивања у примени hIFN-а. Овим је условљена неоправдана резерва многих клиничара према hIFN-има добијеним из хуманих леукоцита, а болеснике лишило овог драгоценог лека. У основи ограничене клиничке примене hIFN-а био је неоправдан страх од преношења узрочника крвљу преносивих болести иако се, савременим ензимоимуним ("ELLISSA") тестовима треће генерације и насјасавременијим "Nucleid Acid Testing - PCR" тестирањем, смањује ризик "феномена прозора" на најмању могућу меру.

У првом периоду развоја сазнања о hIFN-има, који је трајао од 1957. до средине шездесетих година прошлог века, развијане су студије које су се бавиле испитивањем антивирусних активности IFN-а, за који се тада сматрало да је то једини биолошки ефекат који поседују hIFN-и. Значај ових истраживања је откриће да не постоји само једна, већ више класа hIFN-а. То је основа за касније открића фамилије IFN-ских гена који кодирају IFN-е (21). Прву класу IFN-а стварају првенствено леукоцити (данас означен као IFN- α), друга се предоминантно синтетише у фибробластима (IFN- β). Ове две класе IFN-а стварају готово сви сисари и имају слично (готово идентично дејство) и разврстане су у "тип I" IFN-а. Још тада је установљено да нормалне ћелије обично не синтетишу детектабилне количине IFN-а, али и да вирусна инфекција може бити индукциони агенс за синтезу IFN-а у ћелијама.

Трећа класа IFN-а се ствара у *стимулисаним лимфоцитима* (IFN- γ , "имуни" или "тип II" IFN-а) (15, 17-21, 46, 48).

Gresser је у својим истраживањима (1961) пошао од почетне претпоставке до које се дошло при открићу IFN-а да, **IFN** **продукован из хуманих леукоцита *in vivo*** доприноси природној одбрани организма од вирусне инфекције. Значај истраживања IFN-а као **антивирусог биотехнолошког терапијског средства**, огледа се у открићу фамилије хуманих интерферона (17-9, 56, 57). Такође, **Gresser** је први дошао на идеју да употреби хумане леукоците из периферне крви као потенцијални извор за производњу **hIFN-а**. Каснија испитивања потврдила су ову његову претпоставку као практично применљиву. **Gresser** се није задовољио овим достигнућима, већ је предложио да се **hIFN**, добијен продукцијом из хуманих леукоцита *in vivo*, употреби за детекцију вируса и дијагностику вирусних болести у *in vitro* условима (21, 56, 57). Након тога, рађени су експерименти на продукцији и "пурификацији" пилећег IFN-а, а у експериментима су коришћене и **друге хумане ћелије и ткива које су тестиране у продукцији IFN-а**. Подстакнут ранијим Gresser-овим студијама, **Alick Isaacs** је 1962. године, у својим испитивањима проверавао Gresser-ову хипотезу о могућностима употребе хуманих леукоцита за широку и рутинску продукцију **hIFN-а**. Марта 1963. године урађени су први експерименти на добијању **hIFN-а** из хуманих леукоцита. Принос **hIFN-а** тада је био веома низак, али у првим експериментима са хуманом леукоцитном суспензијом, принос **hIFN-а** био је око десет пута већи од приноса који је добијен из других хуманих ћелија (56).

Средином шездесетих година прошлог века, бројни истраживачи дошли су до сазнања да IFN инхибира развој различитих врста карцинома код експерименталних животиња (17-23, 65), и да примена IFN-а има **повољан ефекат** у третману **остеосаркома, мултиплог мијелома, меланома, карцинома грудног коша и одређених типова леукемија и лимфома у људи** (13, 17, 21-3, 65).

"The American Cancer Society" и "USA National Cancer Institute" обезбедили су 2 милиона долара за набавку око 40 билиона интернационалних јединица (IU) **hIFN-а** и клинички третман **150 пацијената оболелих од карцинома грудног коша** за период од два месеца. **Cantell** је са сарадницима прихватио изазов за **увођење масовне производње "супер" интерферона (hIFN-а) из суспензије хуманих леукоцита**, која као нус-продукат остају после издвајања БЦ-а из јединице конзервисане целе крви за припремање препарата концентрованих тромбоцита (17, 41, 42). Још тада је било ја-

сно да су количине hIFN-а добијеног из суспензије хуманих Ле недовољне да задовоље клиничке потребе, као и потребе експерименталних студија. Након тога, Cantell је прорачунао да не би било довољно да се употреби укупна количина "buffy coat-a" од свих добровољних давалаца крви из целог света, за задовољење укупних потреба у hIFN-а. Зато се у наредном периоду трагало за новим методама и технологијама у производњи већих количина hIFN-а.

У току другог периода истраживања на IFN-има од средине шесте до средине седме деценије двадесетог века, развијана је техника пречишћавања hIFN-а са натријум додецил сулфатом (СДС и радило се на употреби СДС-полиакриламид гел елетрофорезе као моћног поступка у пурификацији hIFN-а (21, 64). Друго важно достигнуће овог периода било је откриће да IFN сем антивирусне активности, поседује и инхибиторну активност ћелијске мултипликације и ћелијску регулаторну активност. Тако се дошло до сазнања да IFN испољава велики број биолошких ефеката који нису могли бити доказани у недостатку довољних количина пречишћеног hIFN-а (21). Средином 1960-тих бројни истраживачи дошли су до сазнања да hIFN инхибира развој прото-онкогена, а самим тим и различитих врста карцинома код експерименталних животиња (17-21), али и да примена hIFN-а има повољан ефекат у третману остеосаркома, мултиплог мијелома, меланома, карцинома грудног коша и одређених типова леукемија и лимфома код људи (18, 29, 21).

Од 1970. године процесирање јединица конзервисане целе крви било је усавршено и "buffy coat-a" је био признат у свету медицине као најбитнији извор за добијање hIFN-а (17). Међутим, мали број лабораторија у свету, који је радио на производњи hIFN-а, имао је неуједначен и низак ниво продукције и приноса hIFN-а у жељеним серијама (18, 29, 21). У својим истраживањима Jan Vilček и Edward Havell (1975) (18) дошли су до сазнања да постоји фамилија IFN-а која садржи више класа IFN-а које су разврстани у два типа hIFN-а. Иако су још тада закључили, IFN добијен из хуманих леукоцита (hIFN- α) разликује се од IFN-а (hIFN- β) кога продукују фибробласти (ћелије везивног ткива). Прве две класе hIFN-а имају сличне, готово исте функције, и луче их готово сви сисари и разврстани су у "IFN-е типа I". Трећу класу hIFN-а идентификовали су други истраживачи и назвали га Т или "имуни IFN", јер је добијен продукцијом сензибилисаних Т-лимфоцита имуног система и разврстали су га у интерферон типа II. Откривено је и да су сви IFN-и, било да су

хуманог или другог порекла, по хемијској структури гликопротеини са молекулском масом од 15 до 20 кD (15, 18, 21, 46, 47).

У трећем периоду истраживања, који је започео са открићем рекомбинантног IFN-а (rIFN-а) Taniguchi-а и сарадника (1979) и траје све до данас. Појавиле су се потребе за новим клиничким студијама које су захтевале веће количине hIFN-а. Производња hIFN- α надмашивале су потребне количине које би могле да буду произведене из хуманих леукоцита (13, 17, 21).

Од кад је IFN први пут описан као посебан протеин продукован у домаћину након вирусне инвазије са антивирусном активношћу, уколико је био пренет у свежа ткива, због инхибиције репликације вируса. Претпоставља се да је IFN главни посредник природне отпорности организма и његова ендогена продукција се повећава са деловањем специфичних стимулатора (1, 3, 10, 53).

На основу досадашњих испитивања, дошло се до закључка да је IFN веома потентан антивирусни агенс. Констатовано је да око један милион ћелија могу да заштите веома мале количине IFN-а (од 3 пикограма) од дејства десет милиона вирусних партикула. Ова испитивања су показала да IFN може деловати на веома малим молекуларним нивоима у ћелији, односно на фентомоларним (10^{-15} мола) нивоима (20). Зависно од типа ћелија домаћина, инфективне дозе вируса и типа IFN-а који се користи зависи осетљивост вируса који је варијабилан параметар. Закључено је да је за успостављање антивирусног стања потребно нешто више од 50 молекула IFN-а по ћелији (21). То значи да IFN може деловати у веома ниским концентрацијама и може деловати на веома малим молекуларним нивоима у ћелији да би успоставио антивирусно стање у ћелији.

IFN-и успоравају све фазе ћелијског циклуса у многим ћелијама, посебно G_0 и G_1 фазу (20). Зато се сматра да IFN-и инхибирају ћелијску пролиферацију активирајући одређени сет гена, координирају и балансирају експресију гена који нормално регулишу ћелијску пролиферацију (21). Антипролиферативни ефекат IFN-а огледа се не само у активацији неких ћелијских гена, већ и у инхибицији других гена који инхибишу транскрипцију гена, посебно ћелијских прото-онкогена (20). IFN-и су по хемијској сруктури полипептиди који инхибирају раст како нормалних тако и трансформисаних ћелија у веома ниским концентрацијама, нешто вишим од потребних за успостављање антивирусног стања. Концентрација IFN-а способна да изазове антипролиферативни ефекат на нормалне или трансформисане ћелије изно-

си $50 \text{ pg (} 10^{-9} \text{ g)}$ до $5 \text{ ng (} 10^{-6} \text{ g)}$ по милилитру (20), или 1 до 1 000 IU/ml. Иако све класе IFN-а имају инхибиторни ефекат на ћелијску пролиферацију запажен је нарочито изражен антипролиферативни ефекат код IFN- γ (14, 17, 21).

Имуномодулаторне активности IFN-а испољавају се његовим многоструким дејствима на макрофаге, Т- и Б-лимфоците, као и на ЛГЛ-ћелије са НК-активношћу, односно имуномодулаторне активности IFN-а посредоване су његовим дејствима на ћелије одговорне за одбрану организма (19).

Клонирање IFN-ских гена помоћу DNK технологије могуће је у технолошки развијеним и богатим земљама. Све до проналаска рекомбинаних IFN-а (rIFN-а), hIFN-и су се могли производити у земљама у развоју и земљама са слабијим технолошким напретком. Важно је истаћи да препарати hIFN- γ ништа не заостају за препаратима rIFN- γ у повољним терапијским и клиничким ефектима, као и у лечењу бројних вирусних обољења, малигних тумора и одређених врста леуке -мија. Препарати hIFN- γ су, насупрот рекомбинантним препаратима rIFN- γ , далеко јефтинији и приступачнији за широку клиничку употребу. Треба напоменути да су препарати hIFN- γ терапијски потпуно сигурни јер се БЦ производи само из јединица крви које су серонегативне на присуство маркера крвљу преносивих болести, тестираних ензимоимуним ("ELLISSA") тестовима треће генерације и "Nucleid Acid Testing - PCR" најсавременијом технологијом за тестирање хемопродуката. У производњи hIFN- γ строго се поштују принципи асепсе и антисепсе и стандарди Светске здравствене организације (SZO) у контроли лекова.

Појава леукоцитопеније (број Ле $< 2,5 \times 10^9/\text{L}$), тромбоцитопеније (број тромбоцита $< 50 \times 10^9/\text{L}$), малаксалости и повишене телесне температуре и/или појава неких нехематолошких токсичних ефеката (неуротоксично дејство), чешћа појава ауто-имуних болести (због појачане експресија антигена класе II система-HLA), само су неки од споредних ефеката лечења rIFN-а који се наводе у литератури (3, 19-21). Врло често се наводи резистенције болесника на хроничном програму лечења rIFN-ом као последица синтезе и деловања неутралишућих и/или везујућих антитела усмерених против rIFN-а (13).

Противуречности производних могућности биотехнолошког поступка производње hIFN- γ и генетског инжињеринга у производњи rIFN- γ су:

- Раније примењиваним модификованим биотехнолошким поступком - "Cantell"- овим методом за продукцију hIFN- γ , из јединствене сировине која

се одбацује при делеукоцитирању крви добровољних давалаца као "нус" - производ (који може да изазове бројне посттрансфузионе реакције) добијају се **знатно јефтинији hIFN- γ , биолошки најприроднији, али у недовољним количинама.**

- **Генетским инжињерингом** постигнута је "масовна" производња која је задовољила експерименталне и клиничке потребе за rIFN- γ , знатно су скупљи препарати rIFN- γ и изазивају одређене неповољне ефекте код пацијената на хроничном програму терапије rIFN- γ (13, 17, 21).

Због великог значаја hIFN- γ у терапији, развијани су биотехнолошки поступци у њиховој производњи код нас и у свету. Количине суспензије леукоцита ("buffy coat"-а) нису могле да задовоље њихове потребе, па је неколико технолошки најразвијенијих земаља у свету приступило генетском инжињерингу и "масовној" производњи препарата rIFN- γ . Као што је већ речено, иако су једнаки по квалитету, препарати rIFN- γ у односу на hIFN- γ драстично су скупљи и доступни су само малом броју технолошки најразвијених земаља света.

Треба напоменути да у доступној литератури (40-42, 106-8, 122) има врло мало описаних метода производње hIFN- γ из пречишћене суспензије хуманих леукоцита и израда ове докторске дисертације има доста специфичности у односу на испитивања других аутора, а то су:

А) До сада нису разрађени други поступци за припремање хуманих леукоцита из јединице целе крви за производњу hIFN- γ .

Б) Нису детаљно испитани: време, начин складиштења јединица "buffy coat-а" од момента припреме до момента примене пречишћене суспензије леукоцита, као полазна сировина за индукцију hIFN- γ .

В) У доступној литератури (40-42, 106-8) нису приказани резултати морфологије, вијабилности и приноса леукоцита, односно активности и титра hIFN- γ добијене из исте пречишћене суспензије леукоцита.

Г) У овој докторској дисертацији није могао да буде проверен основни циљ дисертације са другим истраживањима, а он се је састојао у изналажењу бољег биотехнолошког поступка за обезбеђење вијабилнијих леукоцита из "buffy coat-а", који је одбациван као "нус"-производ, и за обезбеђење већег титра и приноса hIFN- γ из пречишћене суспензије леукоцита.

Д) Због значаја неутрофила у продукцији hIFN- γ , у докторској дисертацији испитивали смо садржај неутрофила у појединим испитиваним хемопродуктима и закључили смо да су средње вредности апсолутног броја неутрофила за све три испитиване серије приближно исте (око $1,6 \times 10^9$), што говори да је примена руло-формирајућих агенаса 10% декстрана у ЕСБЦ-I издвојено просечно $1,497 \pm 0,260$ неутрофила, а применом 6% ХЕС-а у ЕСБЦ-II просечно је издвојен највећи број неутрофила ($1,522 \pm 0,283$), док је најмањи просечан број неутрофила ($1,357 \pm 0,254$) издвојен у КСБЦ употребом досадашњег "Cantell"-овог метода пречишћавања са 0,83% NH_4Cl . После припреме у ЕСБЦ-II просечно је издвојено 97,87% неутрофила из ЈЦК, у јединици БЦ-а из ЕСБЦ-I просечно је издвојено 94,95% неутрофила из иницијалних ЈЦК, а у јединици БЦ-а из КСБЦ издвојено је знатно мање неутрофила (89,60%) у односу на експерименталне серије.

Просечно је издвојено 93,11% неутрофила у пречишћеној суспензији Ле у групи ЕСБЦ-I ($1,392 \pm 0,109$); 94,04% у групи ЕСБЦ-II ($1,423 \pm 0,105$); док је нешто више неутрофила (96,29%) издвојено из пула КСБЦ у пречишћеној суспензији леукоцита ($1,141 \pm 0,133$).

Е) То је разлог што није било могуће детаљно упоредити и коментарисати резултате ове студије са резултатима других истраживања.

Cantell и сарадници (1974) развили су метод за продукцију и парцијално пречишћавање hIFN- γ за клиничку употребу, а Cantell и Hirvonen (1977) усавршили су овај метод (41, 42). Овим методом хумани леукоцити намењени су за производњу hIFN- γ добијени из јединице целе крви (450 ml) у систему пластичних кеса ("Fenwal R 1632") са 80 ml цитрат-фосфат-декстрозе као антикоагуланс-конзервишућег раствора, узета од здравих добровољних давалаца, и не сме бити старија од 6 сати. Процеси-рањем из јединице целе крви издвојено је просечно 40 ml суспензије леукоцита - "buffy coat-a" (БЦ-а) (1, 3, 8, 10, 11, 32-8). Пул БЦ-а је складиштен преко ноћи (не дуже од 24 сата) на температури од $+4^\circ\text{C}$. Пречишћавање пула БЦ-а и одстрањивање (односно "лизирање") еритроцита и других адхерентних серумских беланчевина вршено је искључиво помоћу два третмана са хладним раствором 0,83% NH_4Cl као руло-формирајућим агенсом, који је претходно складиштен у хладној комори на температури од $+4^\circ\text{C}$. "Пречишћена" суспензија леукоцита уливана је у стаклене балоне запремине два или шест литара са раније припремљеном подлогом чија је рН вредност подешена на 7,4. После двочасовног мешања суспензије леуко-

цита, са подлогом на магнетној мешалици, додаван је "Sendai" вирус и индукција је трајала 17 сати. Сирови hIFN- γ добијен је из БЦ-а преципитацијом (таложењем) у KSCN (калијум тиоцијанату) при вредностима рН од 3,5. После тога сирови hIFN- γ је растваран у киселом етил алкохолу и нечистоће су из њега селективно преципитиране подизањем вредности рН. hIFN- γ је исталожен са етанолским раствором до неутралних вредности рН, а касније је концентрисан и фракционисан у "пречишћени" препарат hIFN- γ (41, 42, 121).

Према нашој методологији рада коју смо примењивали у докторској дисертацији, припремали смо јединице "buffy coat-a" (БЦ-а) испитиваних серија из јединица целе крви (не старије од 6 сати после ексфузије од добровољних давалаца). Јединице целе крви (ЈЦК) узете су од небираних, здравих давалаца у систему пластичних кеса ("Тегито", Токио, Јапан), и то у волумену од 450 ml крви у 63 ml раствора цитрат-фосфат-декстрозе, као антикоагуланс-конзервишући раствор. Након диферентног центрифуговања, користили смо процесор крвних ћелија и њиме смо аутоматизованим поступком раздвајали поједине крвне компоненте из ЈЦК. Овим аутоматизованим поступком из ЈЦК издвајали смо просечно 50 ml по јединци БЦ-а. Јединице БЦ-а контролне серије (КСБЦ) припремали смо досадашњом техником која је до сада примењивана у "Институту за трансфузиологију ВМА". Свака серија КСБЦ складиштена је на амбијенталној температури (+18 до +22 °C) и складиштење је трајало је не дуже од 16 сати од припремања БЦ-а. Јединице БЦ-а експерименталне серије (ЕСБЦ-I и ЕСБЦ-II) складиштене су у инкубатору, на константној температури од +22 °C, уз перманентно хоризонтално тресење (80 обртаја/минут). Складиштење јединица БЦ-а експерименталних серија трајало је исти временски период као и контролне серије, односно не дуже од 16 сати од припреме БЦ-а (121, 122).

Пречишћавање суспензије леукоцита из КСБЦ вршили смо лизирањем еритроцита раствором 0,83% NH_4Cl , устаљеним поступком који смо до тада користили у "Одсеку за производњу интерферона Института за имунологију и вирусологију Торлак". Користили смо модификовани "Cantell"-ов метод за продукцију hIFN- γ из пречишћене суспензије леукоцита контролне серије (КСБЦ) који је редовно примењиван. Након два сата мешања у пречишћену суспензију леукоцита КСБЦ убацивали смо "Sendai" вирус (као индуктор синтезе hIFN- γ). Индукција је трајала 18 сати уз перманентно мешање у воденом купатилу на температури + 37 °C. После завршене индукције hIFN- γ смесу смо центрифуговали и добили "сирови"

hIFN- γ у супернатанту. Пречишћавање "сировог" hIFN- γ вршили смо применом хемијског метода уз употребу пето моларног раствора калијум тиоцијаната (5M KSCN), једнонормалног раствора хлороводоничне киселине (1N HCl) и 0,1-но нормалног раствора натријум хидроксида (0,1 N NaOH), тако што смо **снижавали вредност рН од 7,3 на 3,8**. Издвојени hIFN- γ таложили смо центрифуговањем и растварали га у фосфатном пуферу (ПБС-у). Тиме смо добијали за **50% концентрованији hIFN- γ** од онога који се налазио у "сировом" hIFN- γ . За све време извођења модификованог Cantell-овог метода вршили смо мерење вредности рН (112).

Из око 170×10^6 леукоцита у пречишћеној суспензији леукоцита експерименталних серија БЦ-а (ЕСБЦ-I и ЕСБЦ-II), ресуспендовали смо у МЕМ-у. За индукцију hIFN- γ из ЕСБЦ-I и ЕСБЦ-II користили смо подлогу истог састава као и за КСБЦ, следећег састава: 849 ml МЕМ-а вредности рН од 7,35; 50 ml А-гама (γ) серума - 20 mg/ml. У овако припремљену подлогу ЕСБЦ-I и ЕСБЦ-II додавали смо ресуспендовану пречишћена суспензија леукоцита. Подлогу смо третирали са "лиофилизованом фитохемаглутинином" - ПХА-II као индуктором синтезе за hIFN- γ . Индукција hIFN- γ трајала је 48 сати на +37 °C и 24 сата на +40 °C, уз перманентно мешање на магнетној мешалици у воденом купатилу. Након завршене индукције hIFN- γ , смесу смо центрифуговали и добијали смо "сирови" hIFN- γ . Концентрацију "сировог" hIFN- γ вршили смо центрифуговањем. Након овога, "сирови" концентрисани hIFN- γ разливали смо у пластичне боце и замрзавали у дип-фризу на температури од - 60 °C (122).

Испитивања који смо ми користили у докторској дисертацији, показала су да је биотехнолошки поступак продукције hIFN- γ био много ефикаснији и да је давао већи принос и бољи титар добијених препарата hIFN- γ у односу на претходни поступак који је још седамдесетих година двадесетог века користио Cantell. "Buffy coat" који смо ми припремали, издвајан је на аутоматском процесору крвних ћелија у већем волумену (50 ml БЦ-а, у односу на 40 ml БЦ-а издвојен мануелном методом – по ЈЦК, по ранијем "Cantell"-овом методу). У нашим истраживањима, припремљени "buffy coat-a" (БЦ) складиштен је краће (не дуже од 16 сати од узимања крви на собној температури), док је ранији "Cantell"-ов метод подразумевао складиштење "buffy coat-a" у хладној комори на +4 °C не дуже од 24 сата (овде је дошло до појачане хемоллизе еритроцита у "buffy coat-y" припремљеном по ранијем "Cantell"-овом методу). У нашим испитивањима повећање садржаја

еритроцита у пречишћеној суспензији леукоцита контролних серија утицало је на већи пад вијабилности леукоцита (90%) у односу на суспензије Ле експерименталних серија, где се вијабилност леукоцита кретала у границама од 95% до 96%.

Код других аутора (108) анализом приноса hIFN- γ добијеног из леукоцитних концентрата (БЦ-а) у периоду од 9 месеци припремљено је 51.688 јединица БЦ-а при чему је добијено 629 билиона IU сировог hIFN- γ . Синтеза hIFN- γ у овим испитивањима била је веома варијабилна од серије до серије, а титар hIFN- γ кретао се од најнижих вредности (25 100 IU) до највиших вредности (219 000 IU). Анализом вредности титра hIFN- γ који је приказан хистограмом у овим испитивањима (108), може се уочити да су се вредности титра hIFN- γ кретале у границама $83\ 100 \pm 38\ 200$ IU, а средња вредност титра hIFN- γ била је 78 000 IU. Cantell и сарадници (48) анализирали су 1.871 јединицу сировог hIFN- γ и средњи титар hIFN- γ био је 43 000 IU/ml. Испитивањима у докторској дисертацији дошли смо до резултата који указују да је просечни титар hIFN- γ у све три испитиване серије био већи од претходно наведених резултата Cantell-ових истраживања (48, 108). Већи просечан титар hIFN- γ добијен у нашим испитивањима због продужене индукције суспензије леукоцита "Sendai" вирусом (осамнаест сати), у односу на резултате споменутих Cantell-ових истраживања (48, 108) где је индукција суспензије леукоцита "Sendai" вирусом трајала краће (седамнаест сати).

Анализом просечног титра hIFN- γ у нашим истраживањима доказали смо да је најмањи просечан титар hIFN- γ добијен из КСБЦ-а (48 142,86 IU), нешто већи просечан титар hIFN- γ добијен је из ЕСБЦ-I (67 571,43 IU), а највећи просечан титар hIFN- γ добијен је из ЕСБЦ-II (73 428,57 IU). Ово указује да су средње вредности титра hIFN- γ из узорака КСБЦ мање за 34,44% од средњих вредности титра IFN- γ у узорцима ЕСБЦ-II, а за око 28,75% мање од средњих вредности титра IFN- γ у узорцима ЕСБЦ-I (122).

Упоређивањем резултата Cantell и сарадника (48) са резултатима добијеним у нашој студији, може се закључити да је просечан титар hIFN- γ (43.000 IU) добијен у њиховој студији био нижи чак и од титра у нашој контролној серији (48 142,86 IU), а скоро двоструко нижи од титра добијеног у нашим испитивањима у експерименталним серијама ЕСБЦ-I (67 571,43 IU) и ЕСБЦ-II (73 428,57 IU).

Сличне резултате добили смо у нашим истраживањима и при испитивању квалитета hIFN- γ добијеног из контролне и из експерименталних серија БЦ-а

(ЕСБЦ-I и ЕСБЦ-II). Доказали смо, при испитивању квалитета hIFN- γ и његове анти-ћелијске активности из контролних серија, да су резултати били негативни, односно нису нађене никакве промене на ћелијама испитиваног ткива, а број ћелија у испитиваном ткиву остао је исти. Контрола антивирусне активности hIFN- γ добијеног из ЕСБЦ-I показала је антивирусну заштиту "monoleja" у разблажењу 1 : 10 000 већу од 50%, а контрола антивирусне активности hIFN- γ добијеног из ЕСБЦ-II показала је антивирудну заштиту "monoleja" у разблажењу 1: 5 000 већу од 50%. Тиме је доказана двоструко већа активност hIFN- γ добијеног из ЕСБЦ-II. При контроли антићелијске активности hIFN- γ добијеног из ЕСБЦ-I на "Hella" ткиву дошло се до позитивног резултата у разблажењу 1:500, а контрола антићелијске активности hIFN- γ добијеног из ЕСБЦ-II на "Hella" ткиву показала је позитиван резултат у разблажењу 1:100 већу од 50%. Запажено је да је антићелијска активност hIFN- γ добијеног из ЕСБЦ-II петоструко већа од hIFN- γ добијеног из ЕСБЦ-I (112). Треба истаћи да нису нађени литературни подаци о биотехнолошким поступцима продукције hIFN- γ из пречишћене суспензије хуманих леукоцита, те се презентовани резултати наших испитивања не могу упоређивати са испитивањима других аутора.

Анализа биотехнолошког поступка продукције hIFN- γ , указује на следеће предности:

1. хумани леукоцити који се користе за продукцију hIFN- γ вијабилни су и имају довољну индукциону способност да се пречишћена суспензија леукоцита може користити за продукцију hIFN- γ ;
2. Иако је "лиофилизоване фитохемаглутинин" - ПХА-II, који је коришћен као индуктор синтезе за hIFN- γ , слабији индуктор синтезе од "Sendai" вируса, показали смо нашим истраживањима да се и са њим може постићи ефикасна продукција довољних количина hIFN- γ ;
3. Биотехнолошки поступак продукције hIFN- γ траје много дуже (индукција суспензије леукоцита "лиофилованим фитохема-глутинином" - ПХА-II траје 72 сата);
4. Биотехнолошки поступак продукције hIFN- γ захтева сложенију контролу квалитета јер захтева контролу цитопатогеног ефекта и контролу антићелијске активности;

5. Биотехнолошки поступак **продукције hIFN- γ из пречишћене суспензије хуманих леукоцита даје бољу вијабилност леукоцита (95% до 96%) у односу на до сада коришћен модификовани "Cantell"-ов метод (90%), као и већи просечан титар hIFN- γ (од 67 571,43 IU до 73 428,57 IU).**
6. **"Лиофилизовани фитохема-глутинин" - ПХА-П, иако слабији индуктор синтезе hIFN- γ од "Sendai" вируса (за његову индукцију потребно је тродневно излагање пречишћене суспензије леукоцита на различитим температурама), нетоксичан је и биолошки најмање штетан након "пурификације" (пречишћавања) у односу на "Sendai" вирус.**

Према подацима из литературе (2, 4, 28-31, 67, 71) јединице БЦ-а до употребе за производњу ИНФ- γ , складиштене су на амбијенталној температури од 20 ± 2 °C у периоду не дужем од 16 сати од узимања јединица крви. Нека испитивања (61) складиштења јединице БЦ-а на температурама од +4 °C и +22 °C вршена су само у циљу утврђивања вијабилности тромбоцита, али не и леукоцита. Miyamoto и Sasakawa у својим студијама (51, 55) испитивали су утицај хоризонталног трешења на вијабилност концентрованих гранулоцита за терапијску примену који су складиштени су на температури од +22 °C. Они су утврдили да током складиштења није дошло до промена у броју, морфологији гранулоцита, нити је дошло до функционалних промена. Њихова препорука је да се складиштење концентрованих гранулоцита за терапијску примену врши на температури од +22 °C, уз лагано хоризонтално трешење.

У контролним серијама БЦ-а у нашим испитивањима (121, 122) и у испитивањима других аутора (52-5) пулови БЦ-а били су са великом еритроцитном контаминацијом, понекад већом од $0,7 \times 10^{12}$ еритроцита/литар БЦ-а. Велики садржај еритроцита у пуловима БЦ-а је узрок и високих концентрација хемоглобина због неопходне хемоллизе еритроцита која се користила у поступку пречишћавања пула БЦ-а третманом са хладним 0,83% NH_4Cl . Хемолизирани еритроцити и "адхерентни" серумски протеини смањују принос леукоцита у пречишћеној суспензији за индукцију Sendai вирусом и смањују титар hIFN- γ у финалном препарату hIFN- γ (122).

Подаци из литературе (47, 50) указују да примена неких руло-формирајућих агенаса за еритроците, као што су раствор 10% декстрана, 6% хидроксиетилног скроба или препарата желатина, могу успешно отклонити еритроците из препарата концентрованих гранулоцита и издвојених на сепаратору крвних ћелија. Постоје

скромна искуства и мало доступних литературних података о отклањању еритроцита из пулова БЦ-а помоћу раствора 10% декстрана (27, 70) и 6% ХЕС-а високе молекулске масе (48, 106) као руло-формирајућих агенаса за еритроците.

Подаци из литературе у испитивањима других аутора (41, 48) указују на чињеницу да је из јединице конзервисане целе крви (450 ml) издвајено мануелно просечно 40 ml по јединици БЦ-а, а у нашим испитивањима из истог волумена целе крви (450 ml) издвојена је већа количина БЦ-а (просечно 50 ml суспензије леукоцита по јединици БЦ-а). У нашим истраживањима применили смо савременији метод аутоматског раздвајања крвних компоненти помоћу процесора крвних ћелија. Савременијим поступком процесирања крви и применом руло-формирајућих агенаса за еритроците (раствори 10% декстрана и 6% ХЕС високе молекулске масе), у нашим испитивањима добијен је мањи губитак леукоцита у пречишћеној суспензији леукоцита (3-6%).

Док литературни подаци (27) указују да је губитак леукоцита у пречишћеној суспензији био знатно већи (око 30%), јер су за ослобађање од еритроцитне контаминације искључиво користили модификовани "Cantell"-ов метод лизирања еритроцита третманом са хладним 0,83% NH_4Cl . У свим нашим испитивањима (122) запажа се да је у свим испитиваним јединицама БЦ-а издвојено отприлике исти процентуални однос леукоцита у односу на почетне вредности у ЈЦК (ЕСБЦ-I - 91,27%; ЕСБЦ-II – 91,93% и КСБВ – 90,76%). У току наших истраживања показали смо да су **средње вредности апсолутног броја леукоцита у ЈЦК**, из којих су припремани БЦ, за све испитане серије биле приближно исте (око $2,5 \times 10^9$). Наша испитивања су недвосмислено показала да је током складиштења број Ле смањен за око 19 до 20% у јединицама БЦ-а (ЕСБЦ-I = $1,998 \pm 0,237$ и ЕСБЦ-II = $2,003 \pm 0,227$) складиштеним у инкубатору на константној температури од $+22^\circ \text{C}$ уз перманентно хоризонтално трешење (80 обртаја/минут), а знатно више у БЦ-у складиштеном на амбијенталној температури (КСБЦ = $1,821 \pm 0,210$). Ово се дешава првенствено због тога што су **средње вредности леукоцита у свим испитаним серијама значајно веће у ЈЦК у односу на БЦ после припреме и БЦ после складиштења** и зато што је просечно издвојено мање леукоцита у БЦ-а после припреме (за око 8-9%), а знатно мање леукоцита је издвојено у БЦ после складиштења (око 18,7-26,5%).

Наше истраживања су показала већи просечан принос леукоцита (по јединици БЦ-а) у пречишћеним суспензијама леукоцита (КСБЦ = $11,572 \pm 0,963$; ЕСБЦ-I = $13,890 \pm 1,463$ и ЕСБЦ-II = $15,200 \pm 0,964$). По резултатима других аутора (27, 28) забеле-

лежили су знатно мањи принос леукоцита (1×10^9 по јединици БЦ-а) у пречишћеној суспензији леукоцита као последица мануелне процедуре процесирања крви и дужег складиштења пула БЦ-а (не дуже од 24h у хладној комори на $+4^\circ\text{C}$). У нашим испитивањима (122) после краћег складиштења испитиваних серија БЦ-а (не дуже од 16 сати) и једносатне седиментације еритроцита помоћу руло-формирајућих агенаса за еритроците добијен већи принос леукоцита и боље је пречишћена суспензија леукоцита. Из пула ЕСБЦ-I просечно смо издвојили у пречишћену суспензију 94,27% леукоцита из иницијалних пулова БЦ-а после седиментације Ер, док је нешто више леукоцита (96,47%) издвојено из пула ЕСБЦ-II после завршене седиментације еритроцита са 6% раствором хидрокси етилног скроба у пречишћеној суспензији Ле, док је у контролној групи БЦ-а (КСБЦ) издвојено 92,68%.

Ово указује на повољан ефекат складиштења експерименталних серија БЦ-а (ЕСБЦ-I и ЕСБЦ-II) на константној температури од 22°C , уз хоризонтално тресење при брзини од 80 обртаја/минут, да би се одржао већи принос леукоцита, висок степен њихове вијабилности и побољшала њихова индукциона способност. Наша испитивања су показала да је вијабилност Ле мање опала у експерименталним серијама БЦ-а (ЕСБЦ-I и ЕСБЦ-II) где је била уједначена (98%), а у КСБЦ вијабилност смањена на 96% после складиштења.

Испитивања која прате промене броја Ле у јединицама БЦ-а, намењених за производњу hIFN- γ , у периоду складиштења, нису нађена у литератури.

У нашим испитивањима (121, 122) запазили смо да су највеће средње вредности броја леукоцита по јединици БЦ-а нађене после једносатне седиментације еритроцита са 6% ХЕС-ом у пулу ЕСБЦ-II ($2,003 \pm 0,227$). Нешто ниже средње вредности броја леукоцита по јединици БЦ-а биле су у пулу ЕСБЦ-I ($1,998 \pm 0,237$) где смо користили 10% декстран као руло-формирајући агенс. Најниже средње вредности броја леукоцита по јединици БЦ-а нашли смо у пулу КСБЦ ($1,821 \pm 0,210$) код којих нисмо користили никакво руло-формирајуће средство (122). Према резултатима неких аутора (71) принос Ле је око 25% нижи после лизирања еритроцита употребом 0,83% NH_4Cl по јединици БЦ-а у односу на третмана ХЕС-ом. Наша испитивања титра hIFN- γ добијеног из 1×10^7 леукоцита, а третираног са ХЕС-ом, био је 3,5 пута већи у односу на титар hIFN третираног са 0,83% NH_4Cl . Овим смо потврдили резултате испитивања других аутора (70, 71) који су указивали на повољно дејство руло-формирајућих агенаса у смањењу броја еритроцита у пречишћеној суспензији

леукоцита. Вијабилност Ле била је смањена у мањој мери у експерименталним серијама (ЕСБЦ-I и ЕСБЦ-II), док је у контролној серији (КСБЦ) вијабилност Ле опала за 10% од оптималне.

Према литературним подацима (13) испитивање броја неутрофила у произведеним контролним и експерименталним серијама БЦ-а, од великог је значаја за деловање hIFN- γ у раној фази имуног одговора на микроорганизме и покретања имуне реакције. Наша испитивања су показала да **средње вредности апсолутног броја неутрофила у ЈЦК**, из којих смо припремали БЦ-и, **за све три серије биле су приближно исте (око $1,6 \times 10^9$)**. После припреме у ЕСБЦ-II просечно је издвојено **97,87%** тих неутрофила из ЈЦК, у јединици БЦ-а из ЕСБЦ-I просечно је издвојено **94,95%** неутрофила из иницијалних ЈЦК, а у јединици БЦ-а из КСБЦ издвојено је **знатно мање неутрофила (89,60%)** у односу на експерименталне серије (ЕСБЦ-I и ЕСБЦ-II). Далјом анализом резултата запазили смо да је током **складиштења број неутрофила смањен у свим испитиваним серијама, у односу на почетне вредности: за 7,67% у ЕСБЦ-I; 6,66% у ЕСБЦ-II, а чак преко 15,75% у КСБЦ**. Тиме смо показали позитиван утицај константне температуре и континуираног трешења на мањи пад броја неутрофила у експерименталним серијама БЦ-а (ЕСБЦ-I и ЕСБЦ-II) у односу на контролну серију БЦ-а (КСБЦ).

На основу морфологије Ле, односно неутрофила који смо због своје важности пратили у различитим фазама испитивања, показали смо да су неутрофили у БЦ-у, после припреме, остали непромењене морфологије и грађе у односу на неутрофиле из ЈЦК. У каснијим фазама испитивања запазили смо изражену базофилију цитоплазме и јаче пребојавање неутрофила у свим испитиваним серијама. То указује на промене у морфологији и грађи Ле у испитиваним пуловима БЦ-а и пречишћеним суспензијама Ле. Нашим испитивањима дошли смо до сазнања да су промене у морфологији Ле мање изражене у експерименталним серијама БЦ-а (ЕСБЦ-I и ЕСБЦ-II) у односу на контролну серију (КСБЦ). Израженије промене морфологије Ле огледају се у појачаном пребојавању, односно израженој базофилији цитоплазме и измењеној морфологији једра Ле у периферном размазу направљеним из узорока БЦ-а контроле серије. Испитивања везана за промене у морфологији неутрофила у пуловима БЦ-а и пречишћеној суспензији Ле, нису нађена у доступној литератури.

У току експерименталних испитивања у дисертацији, при индукцији hIFN- γ из пречишћене суспензије Ле, запажене су следеће појаве (122):

- Променом температуре складиштења раствора 0,83%NH₄Cl и MEM подлоге, сат времена пре извођења модификоване Cantell-ове процедуре, са +4 °C, у хладној комори, на амбијенталну температуру (+18 до +22 °C), нисмо добили боље резултате. У пречишћавању леукоцитне суспензије у експерименталним пуловима (ЕСБЦ-I и ЕСБЦ-II) у односу на пул КСБЦ, дошло је до постепеног лизирања Ер и равномернијег ослобађања хемоглобина као адхерентне беланчевине. Тиме је добијена пречишћенија суспензија леукоцита у односу на суспензију Ле добијених из КСБЦ која је била црвено пребојена. Употребом MEM подлоге за пречишћену суспензију Ле, добијене из пулова БЦ-а експерименталних серија (ЕСБЦ-I и ЕСБЦ-II), постигнута је боља индукциона способност "Sendai" вируса. Тиме је добијена већа анти-вирусна активност hIFN- γ и квалитетнији финални препарати hIFN- γ у експерименталним серијама у односу на контролну серију.
- Употребом руло-формирајућих агенаса за еритроците, 10% раствора декстрана (ММ 250 000 Д) и 6% ХЕС-а (ММ 450 000), у експерименталним серијама БЦ-а (ЕСБЦ-I и ЕСБЦ-II), после једносатног седиментисања еритроцита на амбијенталној температури, запазили смо слабије издвајање супернатанта, односно суспензије Ле (просечно око 50 ml) са 10% декстраном. Овај супернатант није могао да се издваја аспирацијом помоћу вакуум пумпе, већ је читава смеша морала додатно да се обрађује још два пута са 0,83%NH₄Cl. Употребом 6% ХЕС-а, као руло-формирајућег агенса за еритроците, после једносатног седиментисања добијене су јасно издвојене две фазе. Овај седимент је био правилно раздвојен од супернатанта, па је суспензија Ле садржана у супернатанту (270-300 ml) лако могла да се аспирира помоћу вакуум пумпе. Добијена суспензија Ле из пула ЕСБЦ-II била је пречишћенија и садржала је најмању количину "клампсева" (накупине леукоцита) у односу на контролну серију (КСБЦ). Суспензија Ле контролне серије је била најмање пречишћена - садржала је највећу количину "клампсева", била је најцрвенија и најтеже се одвајала са дна боце после центрифуговања. Суспензија Ле добијена из ЕСБЦ-I по квалитету заостајала је за пречишћеном суспензијом Ле добијеном из пула ЕСБЦ-II.

- Испитивањем степена чистоће пурификованог hIFN- γ доказали смо се да је једнак степен чистоће hIFN- γ добијен из КСБЦ и ЕСБЦ-I (0,435 mg/ml), док су hIFN- γ добијени из ЕСБЦ-II имали за 22,75% више протеина (вредност укупних протеина је 0,534 mg/ml).
- Интересантна би била даља испитивања у правцу утврђивања квалитативног састава протеина у hIFN- γ добијених из ЕСБЦ-II. У многим лабораторијама у свету које се баве производњом hIFN-а из пречишћене суспензије леукоцита долазило је до великих проблема у пречишћавању сировог IFN-а, без обзира на метод који се користи у производњи hIFN- γ . Основна тежња свих произвођача је да се добије што чистији финални препарат hIFN-а. Вероватно би, коришћењем неког другог савременијег метода пречишћавања сирових hIFN- γ , био добијен чистији финални препарати hIFN- γ .
- Наша испитивања су показала да су резултати свих узетих узорак за испитивање стерилности били стерилни и показивали су негативну реакцију на токсичност свих испитиваних серија сирових и финалних препарата hIFN- γ . Све то указује на одсуство бактеријске контаминације у процесу производње. Нису откривени ни ендотоксини у испитиваним узорцима који су производ анаеробног загађења. Сви испитивани узорци сирових и финалних препарата hIFN- γ давали су негативну реакцију на тиогликолату.

Важно је истаћи да су експерименти у овој докторској дисертацији рађени са ограниченим бројем узорак у испитиваном пулу (8 јединица БЦ у сваком испитиваном пулу и по 128 јединица БЦ-а у свакој испитиваној серији) због техничке немогућности истовременог праћења свих задатих параметара у различитим временским интервалима. Свакако да би рад са већим серијама БЦ-а омогућио доношење прецизнијих закључака. Битно је напоменути да су у једном дану упоредо испитиване три серије и да су вршене три обраде истовремено, што је продужавало временски интервал од припреме БЦ-а до излагања пречишћене суспензије леукоцита индукцији "Sendai" вирусом у контролној серији и истовременом излагању "фитохемаглутинину" као индуктору синтезе hIFN- γ у суспензији леукоцита експерименталних серија БЦ-а. Чињеница је да ово време треба максимално скратити јер се тиме добија већи принос Ле и квалитетнији финални препарати hIFN- γ .

9. ЗАКЉУЧЦИ

На основу до сада изнетих резултата истраживања може се закључити да је хипотеза ове докторске дисертације у потпуности потврђена. Остварени су постављени циљеви истраживања из којих се могу извести следећи закључци:

1. Константна температура (+22 °C) и хоризонтално трешење током складиштења "buffy coat"-а, имају позитиван утицај на очување морфологије вијабилност, индукционе способности хуманих леукоцита и добијање пречишћеније суспензије леукоцита за продукцију hIFN- γ .
2. Применом новог биотехнолошког поступка успели смо да очувамо морфологију леукоцита, задржан је висок степен вијабилности и индукционе способности леукоцита намењених за производњу hIFN- γ из пречишћене суспензије леукоцита;
3. Оптималан период складиштења јединица buffy coat-а, из којих је припремана суспензија леукоцита за производњу hIFN- γ , не сме бити дужи од 16 сати од момента припреме "buffy coat"-а.
4. Временски период треба максимално скратити од путирања јединица "buffy coat"-а до даље обраде и индукције пречишћене суспензије леукоцита "фитохемаглутинаину" као индуктору синтезе hIFN- γ ;
5. Додавање 10% раствора декстрана и 6% раствора хидроксиетилног скроба у пуловима "buffy coat"-а доприноси добијању квалитетније и пречишћеније суспензије леукоцита са што мањом "контаминацијом".
6. Ово потврђује да је 6% раствор хидрокси етилног скроба бољи као руло-формирајући агенс за еритроците у односу на раствор 10% декстрана. Употребом 6% раствора хидрокси етилног скроба постигнуто је боље отклањање еритроцита у пулу "buffy coat"-а, боља вијабилност и већи принос леукоцита у пречишћеној суспензији леукоцита, као и повећани титар hIFN- γ ;
7. Већи принос и појачана антивирусна активност hIFN- γ у препаратима припремљеним из суспензије леукоцита добијених из пулова "buffy coat"-а

- којима су додати раствори **10% декстрана и 6% хидрокси етилног скроба високе молекулске масе** у односу на суспензије леукоцита припремљених на уобичајени (досадашњи) начин.
8. **Бољи и ефикаснији биотехнолошки поступак продукције hIFN- γ , у односу на досадашњи поступак добијања hIFN- γ модификованим "Cantell"-овим методом.**
 9. **Хумани леукоцити који се користе у биотехнолошкој процедури за продукцију hIFN- γ вијабилнији су и имају већу индукциону способност, док иста суспензија леукоцита која се користи за продукцију hIFN- γ по модификованом "Cantell"-овом методу имају слабији капацитет вијабилности и индукциону способности хуманих леукоцита.**
 10. **"Лиофилизовани фитохемаглутинин - ПХА-II", коришћен као индуктор синтезе за hIFN- γ , иако слабији индуктор од "Sendai" вируса, добар је индуктор синтезе који је успешно индуковао хумане леукоците у пречишћеној суспензији леукоцита, биолошки је мање штетан и нетоксичан.**
 11. **hIFN- γ добијен раније коришћеним модификованим "Cantell"-овим методом, траје краће, једноставнији је за извођење, док биотехнолошки поступак продукције hIFN- γ траје много дуже, сложенији је за извођење и за контролу квалитета.**
 12. **hIFN- γ на ниским температурама је постојан без губитка терапијских својстава, за разлику од рекомбинантних интерферона где је замрзавање забрањено, што је посебно истакнуто у "Упутству за употребу rIFN".**
 13. **Биотехнолошки поступак продукције hIFN- γ из пречишћене суспензије леукоцита у је у великој предности у односу на до сада коришћен модификовани "Cantell"-ов метод за продукцију hIFN- γ , и према вијабилности и индукционој способности леукоцита, као и у односу на титар и принос финалних препарата hIFN- γ .**
 14. **Методе испитивања које смо применили у докторској дисертацији су веома савремене и стандардизоване у свету.**

Важност реализације ове дисертације огледа се и у чињеници да, данас, многе развијене земље у свету (109) примењују најсавременију фармакотерапију и имају у својим терапијским регистрима препарате интерферона. У фармакотерапијској примени препарата интерферона посебно предњаче Сједињене Америчке Државе (110), Велика Британија (111), а препарати интерферона се примењују и у нашој земљи (што је приказано у *Националном регистру лекова из 2007. године*) (112).

10. ЛИТЕРАТУРА

1. Балинт Б, Радовић М, Балинт Ј, Андрић З. Цитокини - модифери хемобиолошког одговора. Билт трансф 1994; 22(2): 13-25.
2. Балинт Б, Радовић М, Пауновић Д, Родић Б, Тасески Ј, Андрић З и сар. Испитивање имуноинфламаторних цитокина IL-6, IL-8 и TNF-а у ускладиштеним концентрованим тромбоцитима. Анест Реаним Трансф 1996; 25(1/2): 39-43.
3. Балинт Б, editor. Хемомодулаторни механизми и терапијски приступ. 1-st ed. Београд: Завод за уџбенике и наставна средства, 1999.
4. Petz LD, Kleinman SK, Swisher SN, Spence RK, Strauss RG, editors. Clinical practice of transfusion medicine. 3-rd ed. New York: Churchill Livingstone; 1996.
5. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, editors. Celular and molecular immunology. 3-rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1997.
6. Roit I, Brostoff J, Male D, editors. Immunology. 5-th ed. London: Mosby International Ltd; 1998.
7. Ress RC. Cytokines as biological response modifiers. J Clin Pathol 1992; 45: 93-8.
8. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M, editors. Blood transfusion in clinical medicine. 9-th ed. Oxford: Blackwell scientific publications; 1993. p. 1-47.
9. Cassatella MA, MD Cytokines produced by polymorphonuclear neutrophils: molecular and biological aspects. Austin: RG Landes Company, 1996.
10. Глигоровић В, Балинт Б, Чалија Б, editors. Основи клиничке трансфузиологије. Ургентна и елективна хемотерапија хемобиолошких поремећаја. 1-st ed. Београд: Завод за трансфузију крви Србије, 1996.
11. Глигоровић В, Балинт Б, editors. Клиничка трансфузиологија. 1-st ed. Београд: Завод за уџбенике и наставна средства, 1998.
12. Boehringer Ingelheim Bioproducts. Cytokines and cytokine receptors. Bender Med Systems 1996; 57-84.

13. Вучелић Д, Глигоровић В, Балинт Б, Мирић М, editors. Интерферони - место и улога у цитокинској мрежи и терапијска примена. 1-st ed. Београд: МЕГ Маркетинг, 2000.
14. Viscomi GC, Grimaldi M, Palazzini E, Silvestri S. Human leukocyte interferon alpha: Structure, pharmacology, and therapeutic applications. *Medical Research Reviews* 1995; 15 (5): 445-78.
15. Stringfellow DA. Interferon and interferon inducers, clinical application. *Modern pharmacology-toxicology* 1980; 17: 1-293.
16. Petestka S, Langer JA. Interferon and their action. *Ann Rev Biochem* 1987; 56:27-77.
17. Eddleston ALWF, Dixon B, editors. Interferons in the treatment of chronic virus infection of the liver. 1-st ed. Cheshire: Pennine Press; 1990.
18. The American Cancer Society (ACS). Interferon (I): on the threshold of clinical application. *Science* 1979; 204: 1183-6.
19. Stites DP, Stobo JD, Wells JV, editors. Основна и клиничка имунологија. 6-st ed. Београд: Савремена администрација; 1987. p. 82-95.
20. Balkwill FR, editor. Cytokines in cancer therapy. 1-st ed. Oxford: United Press; 1989. p. 9-53.
21. Fields BN, Knipe DM et al., editors. *Fields Virology*. 2-nd ed. New York: Raven Press; 1990. p.383-410.
22. Мирић М, Васиљевић Ј, Кесеровић Н, Пешић М, editors. Имуномодулаторна терапија вирусног миокардитиса. У: Недељковић С, Кањух В, Вукотић М, аутори. Кардиологија. 1-st ed. Београд: Завод за издавачку делатност; 1994. п. 642-48.
23. Крстић Ч. Интерферон у лечењу малигних болести. *Војносанит Прегл* 1983; 5: 360-65.
24. Stewart WE, Blalock JE, Burke DC, Chany C, et al. Interferon nomenclature. *Immunology* 1980; 42: 1017-18.
25. Angué M, Chatelain P, Domy M, Guignier F, Richaud P. Préparation de concentrés de plaquettes humaines déleucocytées par centrifugation et filtration d'un pool de buffy-coats connectés stérilement. *Rev Fr Transfus Hémodiol* 1991;34: 9-19.

26. Brozović B, Brozović M, editors. Manual of clinical blood transfusion, 1-st ed. Edinburg: Churchill Livingstone; 1986. p. 59-62.
27. Dipoala M, Smith T, Ferencz - Biro K, Liao MJ, Testa D. Interferon-alpha 2 produced by normal human leukocytes is predominantly interferon-alpha 2b. J Interferon Res 1994; 14(6): 325-32.
28. Eriksson L, Högmán CF. Platelet concentrates in an additive solution prepared from pooled buffy coats. Vox Sang 1990; 59: 140-45.
29. Eriksson L, Eriksson G, Hygman CF. Storage of buffy coat preparations at 22 degrees C in plastic containers with different gas permeability. Vox Sang 1997; 73(2): 74-80.
30. Hirose A, Yamamoto K, Shiraki H, Kiyokawa H, Maeda Y, Yoshinari M. Preparation of white-cell-poor blood components using a quadruple bag system. Transfusion 1988; 28(3): 261-64.
31. Миленковић Љ, Балинт Б, Шкаро-Милић А, Лакић-Трајковић З, Радовић М, Спасић П. Принос и морфологија концентрованих тромбоцита припремљених из buffy coat-а. Војносанит Прегл 1995; 52(1): 18-24.
32. Vengelen-Tyler V, Benson K, Branch DR, Calhoun L, Dzik WH, Leparo GF, McMillan A, et al, editors. Technical manual, 12-th ed. Bethesda: American Association of blood Banks; 1996. p. 115-33.
33. Napier JAF. Blood transfusion therapy: a problem-oriented approach. 1-st ed. Chichester: John Wiley-Sons; 1987. p. 87-97.
34. Napier JAF, editor. Handbook of blood transfusion therapy. 2-nd ed. Chichester: John Wiley-Sons; 1995. p. 95-98.
35. Pisciotto PT, Ciavarella D, Kurtz SR, Lane TA, Morroff G, et al, editors. Blood transfusion therapy. A physician's handbook. 3-rd ed. Arlington: American Association of blood banks; 1989. p. 19-20.
36. Price TH. Plateletpheresis and leukapheresis. In: Rossi EC, Simon TL, Moss GS, editors. Principles of transfusion medicine. 6-th ed. Baltimore: Williams-Wilkins; 1991. p. 527-35.

37. Радовић М: Лечење крвљу, њеним састојцима и дериватима (хемотерапија). У: Стефановић С, Банићевић Б, Јанчић М, Лучић А, Павловић-Кентера В et all., editors. Хематологија. 2-nd ed. Београд: Медицинска књига; 1989. p. 1243-70.
38. Радовић М. Усмерена хемотерапија. У: Радовић М, Мареновић Т, editors. Београд: Удружење анестезиста, реаниматора и трансфузиста Југославије; 1991. p. 5-43.
39. Robert F, Bertholey F, Garic Y, Chataing B: Préparation et conservation des produits labiles obtenus á partir du sang total avec utilisation de la couche leucoplaquettaire. Rev Fr Transfus Hémobiol 1989; 32(6): 451-65.
40. Akerlund K, Bjork L, Fehniger T, Pohl G, Andersson J, Andersson U. Sendai virus-induced IFN-alpha production analysed by immunochemistry and computerized image analysis. Scand J Immunol 1996; 44(4): 345-53.
41. Cantell K, Hirvonen S. Large scale production of human leukocyte interferon containing 10^8 units per милилитер. J Gen Virol 1978; 39: 541-44.
42. Cantell K, Hirvonen S. Preparation and assay of sendai virus. Methods in enzymology 1981; 299-301.
43. Dipoala M, Smith T, Ferencz - Biro K, Liao MJ, Testa D. Interferon-alpha 2 produced by normal human leukocytes is predominantly interferon-alpha 2b. J Interferon Res 1994; 14(6): 325-32.
44. Stewart II WE, Gottlieb A, editors. Interferon and their actions. 1-st ed. Cliveland: CRC PRESS; 1997.
45. Tyth M, Endere'sz V, To'th S, Вйльди I. Human Interferons alpha and beta have more potent priming activities than interferon gama. J Gen Virol 1985; 66(4): 893-6.
46. Warren SL. Interferon - a system of medium quantitu production for therapeutic use. Annals of allergy 1981; 46: 216-22.
47. Berg K, editor. Purification and characterization of murine and human interferons. 1-st ed. Copenhagen: Munksgaard; 1982.
48. Peteska S, Kaplan NO, editors. Methods in Enzymology. Interferons, part A. 78-th ed. New York: Academic Press; 1981. p.3-394.

49. Yip KY, Pang LHR, Urban C, Вилчек J. Partial purification and characterization of human γ (immune) interferon . Proc Natl Acad Sci 1981; 78(3): 1601-5.
50. Yip KY, Barrowclough SB, Urban C, Вилчек J. Purification of two subspecies of human γ (immune) interferon. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79: 1820-24.
51. Braude AI. A simple and efficient method for the purification of human gamma interferon. Preparative biochemistry 1983; 13(3): 177-90.
52. Јерант-Патић В, editor. Имунологија, 1-st ed. Нови Сад: Медицински факултет; 2000.
53. Durum SK, Oppenheim JJ. Macrophage-derived mediators: Interleukin 1, Tumor necrosis factor, Interleukin 6, Interferon, and related cytokines. In: William EP, editor. Fundamental Immunology, 2-nd ed. New York: Raven Press Ltd; 1989. p. 639-61.
54. Stewart II WE, Gottlieb A, editors. Interferon and their actions. 1-st ed. Cliveland: CRC PRESS; 1977.
55. Finkelstein MS, Merigan TC. Interferon - 1968: How much we understand? Calif Med 1968; 109: 24-34.
56. Gresser I, Cantell K, De Maeyer E, Landy M, Revel M, Вилчек J, editors. Interferon 1. 1-st ed. London: Academic press; 1979. p. 1-156.
57. Gresser I, Burke D, Cantell K, De Maeyer E, Landy M, Revel M, Вилчек J, editors. Interferon 9, 1-st ed. London: Academic press; 1987. p. 1-125.
58. Nagano Y, Levy HB, editors. Interferon. 1-st ed. Tokyo: Igaku Shoin Ltd; 1970.
59. Kawade Y. Four stages in the history of interferon research. J Interferon Res 1987; 7: 461-5.
60. Samuel C. Antiviral action of interferon. Virology 1991; 183: 1-11.
61. Johnson H, Bazer F, Szenté B et al. How inteferons fight disease. Sci Am 1994; 58-75.
62. Isacs A, Lindenmann J. Virus interference: I-The interferon. Proc R Soc Lond (B) 1957; 147: 258-63.
63. Tyrel D. Interferon produced by cultures of calf kidney cells. Nature 1959; 184: 452-53.
64. Rubinstein M., Rubinstein S, Fамилletti PC, Gross M.S, Миллер R.S, Waldman at all. (1978) Human leukocyte interferon purified to homogeneity, Science 1978; 202:1289-90.

65. Eddleston ALWF, Dixon B, editors. Interferons in the treatment of chronic virus infection of the liver. 1-st ed. Cheshire: Pennine Press; 1990.
66. McCullough J, Weiblen BJ, Peterson PK, Quie PG. Effects of temperature on granulocyte preservation. *Blood* 1978; 52(2): 301-10.
67. Pietersz RNI, Loss JA, Reesink HW. Platelet concentrates stored in plasma for 72 hours at 22°C prepared from buffy coats of CPD blood collected in quadruple-bag SAGM system. *Vox sang* 1985; 49(2): 81-5.
68. Pietersz RNI, Loos JA, Reesink HW. Survival in vivo of platelets stored for 48 hours in the buffy coat at 4 degrees C compared to platelet rich plasma stored at 22 degrees. *Blut* 1987; 54(4): 201-6.
69. Pietersz RNI, Reesink HW, Dekker WJA, Fijen FJ. Preparation of leukocyte-poor platelet concentrates from buffy coats. I. Special inserts for centrifuge cups. *Vox Sang* 1987; 53(4): 203-7.
70. Pietersz RNI, Reesink HW, Dekker WJA. Preparation of leukocyte-poor platelet concentrates from buffy coats. II. Lack of effect on storage of different plastics. *Vox Sang* 1987; 53(4): 208-13.
71. Pietersz RNI, de Korte D, Reesink HW, van den Ende A, Dekker WJA, Roos D. Preparation of leukocyte-poor platelet concentrates from buffy coats. III. Effect of leukocyte contamination on storage conditions. *Vox Sang* 1988; 55(1): 14-20.
72. Pietersz RNI, Reesink HW, Hujgens PC, van Oers MHJ. Preparation of leukocyte-poor platelet concentrates from buffy coats. IV. Clinical evaluation. *Vox Sang* 1988; 55(3): 129-32.
73. Pietersz RNI, Dekker WJA, Reesink HW. Comparison of conventional quadruple-bag system with a "top-and-bottom" system for blood processing. *Vox Sang* 1990; 59(4): 205-8.
74. Yang XM, et al. Production of recombinant human interferon alpha by *E. coli* using a computer controlled cultivation process. *Journal of Biotechnology* 1992; 23: 291-301.
75. Lindahl HA. Design project for production of IFN-alpha. CHE 496 IPRO [serial online] 2006 May. Dostupno na URL:

- http://www.ucsusa.org/food_and_environment/genetic_engineering/what-is-biotechnology.html
76. Bryan J. Interferon: an important step forward in treating hepatitis C infection. *The Pharmaceutical Journal* 2008; 280: 753-54.
 77. Bryan J. Interferon was not the miracle cure for cancer hoped for in its early days. *The Pharmaceutical Journal* 2008; 280: 637-8.
 78. Gresser J. Biologic effects of interferons. *J Invest Dermatol* 1990; 95(Suppl 6): 66-71.
 79. Langlois R, Lee CC, Cantor CR, Vince R, Pestka S. The distance between two functionally significant regions of the 50s escherichia coli ribosome: the erythromycin binding site and proteins L7/L12. *J Mol Biol* 1976; 106: 297-313.
 80. Miler DL, Kung H.F, Pestka S. Crystallization of recombinant human leukocyte interferon A. *Science* 1982; 215: 689-90.
 81. Greiner JW, Guadagni F, Noguchi P, Pestka S, Colcher D., Fisher PB at all. Recombinant interferon enhances monoclonal antibody-targeting of carcinoma lesions in vivo. *Science* 1987; 235: 895-8.
 82. Cook JR, Emanuel SL, Donnelly RJ, Soh J, Mariano TM, Schwartz B, at all. Sublocalization of the human interferon-gamma receptor accessory factor gene and characterization of accessory factor activity by yeast artificial chromosomal fragmentation. *J Biol Chem* 1994; 269: 7013-18.
 83. World health organization. Standardization of interferons. Technical report series 1988; 771: 37-50.
 84. Eid P, Tovey MG. Characterisation of a domain at a human type I infection receptor protein involved in ligand binding. *J Interferon Cytokine Res* 1995; 15: 205-11.
 85. Hamblin A. Cytokines and cytokine receptor. Oxford: Oxford University Press 1993.
 86. Johnson H, Bazer F, Szente B et al. How interferons fight disease. *J Sci Am* 1994; 68-75.
 87. Bach E, Aquet M, Robert D et al. The IFN- γ receptor: A paradigm for cytokine receptor signaling. *Ann Rev Immunol* 1997; 15: 563-91.
 88. Дујић А, Пејновић Н. Цитокини: регулаторни и ефекторни молекули хомеостазе. У: Мајкић-Синг Н, editor. Примена медицинске биохемије у

- лабораторијској медицини. Београд: Друштво медицинских биохемичара Југославије; 2000. p. 137-60.
89. Beadling C, Guschin D, Witthuhn B et al. Activation of Jak kinases and STAT proteins by interleukins 2 and interferon alpha, but not the T cell antigen receptor in human T lymphocytes. *EMBO-J* 1994; 13: 5605-15.
 90. Boehm U, Klamp T, Groot M. Cellular responses to interferon gamma. *Ann Rev Immunol* 1997; 15: 749-95.
 91. Beck D. L' enfant et les cytokines. *Med et Hyg* 1994; 52(2013): 321-4.
 92. Gillis S. T-cell-derived lymphokines. In: William EP, editor. *Fundamental Immunology*, 2-nd ed. New York: Raven Press Ltd; 1989. p. 621-37.
 93. Rossi E, Simon TL, Dzik WH, Snyder EL, Stowell CP, Strauss RG, editors. *Rossi's principles of transfusion medicine*. London: Lippincott Williams & Willkins; 2002. p. 513-21.
 94. Hovanessian AG. The double stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon: dsRNA-PK. *Journal of interferon research* 1989; 9(6): 641-7.
 95. Gresser I, Burke D, Cantell K, De Maeyer E, Landy M, Revel M, Вилчек J, editors. *Interferon 5*, 1-st ed. London: Academic press; 1983. p. 1-203.
 96. Gresser I, Burke D, Cantell K, De Maeyer E, Landy M, Revel M, Вилчек J, editors. *Interferon 8*, 1-st ed. London: Academic press; 1987. p. 1-54.
 97. Dextran 1 for injection. *European pharmacopoeia*. 5th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2004. p. 1408-12.
 98. Dextran. *The Merck Index. An Encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*. 6-th ed. New York: Merck Research Laboratories; 2006. p. 501.
 99. Dextran. *The Merck Index. An Encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*. 6-th ed. New York: Merck Research Laboratories; 2006. p. 501.
 100. Hetastarch. *The Merck Index. An Encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*. 6-th ed. New York: Merck Research Laboratories; 2006. p. 808.
 101. Cantell K. *Interferons: General aspects and biological properties*. WHO 1987; W. P. N°3.

102. Interferon alfa-2 concentrated solution. European pharmacopoeia. 5th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2004. p. 1812-15.
103. Assay of interferons. European pharmacopoeia. 5-th ed (Suppl. 5.3). Strasbourg: Council of Europe; 2004. p. 3381-83.
104. Interferon alfa-2 concentrated solution. European pharmacopoeia. 5-th ed (Suppl. 5.7). Strasbourg: Council of Europe; 2006. p. 5032-34.
105. Interferon gamma-1b concentrated solution. European pharmacopoeia. 5th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2004. p. 1815-18.
106. Van Oss CJ, Bronson PM, Dinolfo EA, Chadna KC. Two methods for the removal of erythrocytes from buffy coats for the production of human leukocyte interferon. *Immunological Communications* 1981; 10(6): 549-55.
107. Peteska S, Kaplan NO, editors. *Methods in Enzymology. Interferons, part B.* 79-th ed. New York: Academic Press; 1981. p.3-131.
108. Peteska S, Kaplan NO, editors. *Methods in Enzymology. Interferons, part C.* 119-th ed. New York: Academic Press; 1986. p.3-230.
109. Swetman S. Interferon alpha. Interferon beta. Interferon gamma. In: Martin Dale, editor. *The Complete Drug Reference.* 35-th ed. London: Pharmaceutical Press; 2008. p. 794-801.
110. AHFS. Interferon alpha. Interferon beta. In: *American Hospital Formulary Service (AHFS).* 49-th ed. Bethesda: American Society of Health System Pharmacists; 2007. p.p. 752-65; 1079-1102; 3679-85.
111. BNF. Interferon alpha. Interferon beta. In: *British National Formulary (BNF).* 54-th ed. London: BNF. Org.; 2007; p. 472-73.
112. НРЛ. Интерферон 1 α Интерферон 2 α . У: Национални регистар лекова (НРЛ). Београд: АЛИМС; 2007. п.п. 325; 335.
113. Цитокини. Wikipedia, <http://sr.wikipedia.org/sr/Цитокини>, 2011.
114. R. Mire-Cluic and R. Thorpe. *Cytokines (Handbook of Immunopharmacology).* Boston: Academic Press; 1998.
115. Интерферон, Wikipedia, <http://sr.wikipedia.org/sr-ec/Interferon>, 2011.

116. Антивирусне вакцине. <http://cupa.pharmacy.bg.ac.rs/acccetc/4478>, 2011.
117. Интерферон тип I, http://sr.wikipedia.org/sr-ec/Interferon_tip_I, 2011.
118. Интерферон тип II, http://sr.wikipedia.org/sr-ec/Interferon_tip_II, 2011.
119. Интерферон тип III, http://sr.wikipedia.org/sr-ec/Interferon_tip_III, 2011.
120. Interferons Matterc. A quarterly newsletter by PBL Interferon Course, <http://interferoncourse.com>, 2007.
121. Б. Станковић, М. Тркуљић, Б. Балинт, Ј. Тасески, М. Бан, С. Стојановић, et al. "Buffy coat" intended for production of interferon-alpha. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2002; 22 (suppl. 1): S-125.
122. М. Бан, С. Стојановић, Р. Лукић-Радовановић, М. Мићић, Б. Станковић, М. Тркуљић, et al. Some improvements in human leukocyte interferon-alpha production. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2002; 22(suppl. 1): S-167.
123. Станковић Б, Тасески Ј, Тркуљић М et al. Испитивање приноса и индукционе способности хуманих леукоцита припремљених из "buffy coat-a" намењених за производњу интерферона-алфа. *Анестезија реанимација трансфузија* 2002; 30 (1-2): 59-71.
124. Станковић Б, Шурбатовић М, Стојановић Г, Михајловић М, Тамбур З, Кулишић З, Марковић М. Treatment for production of interferon-alpha (IFN- α) and interferon - gamma (IFN- γ) from the same purified suspension of leukocytes. *Scientific Research and Essays* 2011; 6(7): 1522-1529.
125. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004;75(2):163-89.

БИОГРАФИЈА АУТОРА

Станковић (Предрага) Братислав је рођен 03. 01. 1959. године у Нишу у породици здравствених радника.

Основну и средњу школу (гимназију) завршио у Нишу са одличним успехом.

23.11. 1982. године - дипломирао на Медицинском факултету у Нишу у двадесет трећој години живота са просечном оценом 8,52.

Након завршеног лекарског стажа (1985.- 1989.) обављао је дужност Управника "Гарнизонске амбуланте Бенковац" и Начелника санитета (као војни лекар).

Од 1989. до 1992. године завршио специјализацију из трансфузиологије у Институт за трансфузиологију Војномедицинске Академије (оцена ОДЛИЧАН – 5,00).

Од 1992. до 1995. године обављао дужност лекара специјалисте-трансфузиолога у Одељењу за имунохематологију и имуногенетику Института за трансфузиологију ВМА.

Био на дужности Начелника Одељења за имунохематологију и имуногенетику (1995-2001) Института за трансфузиологију ВМА.

Уједно обављао и дужност заступника Начелника Одељења за конзервисање крви у Институту за трансфузиологију (2001. – 2005).

Био на дужности Начелник Одељења за конзервисање крви у Института за трансфузиологију ВМА (2005. – 2009).

Од новембра 2009. године - стално запослен као предавач у Високој здравственој школи струковних студија у Београду на катедри за медицинско-лабораторијске технологе (интерна медицина - хематологија-1 и хематологија-2, трансфузиону медицина и клиничку трансфузиологија и предавач на специјалистичким студијама у Високој здравственој школи струковних студија у Београду).

1996. године - звање Примаријуса.

1996. године - Европска трансфузиолошка школа -"North blood center"- Лондон.

Од 1995. године до фебруар 2001. године завршио последипломске студије из трансфузиологије на Катедри за трансфузиологију ВМА.

28. 02. 2001. године - одбранио магистарску тезу "Испитивање морфологије, приноса и индукционе способности хуманих леукоцита припремљених из buffy coat-a, намењених за продукцију хуманог интерферона-алфа"(оцена ОДЛИЧАН – 5,00).

Стручно-публицистичком делатност - Објавио 112 стручних радова: аутор је једног рада публикованог у целини у часопису међународног значаја (категорија M21), пет радова у целини публиковао у националним часописима (категорија M23), четири рада у целини публиковао у националним часописима (категорија M51); 21 рад је самостално објавио као први аутор у рецензираним часописима од националног значаја, 17 радова саопштио је као први аутор или коаутор на скуповима од међународног значаја (штампани у изводу) и 54 рада је саопштио као први аутор или коаутор на скуповима од националног значаја (штампани у изводу), 3 поглавља у монографијама. Радови су из области клиничке трансфузиологије, имунохематологије трансплантационе медицине и биотехнологије

Више пута усмено излагао актуелне трансфузиолошке теме на састанцима Трансфузиолошке секције СЛД-а, Удружења АРТ, Удружења лабораторијских техничара Србије, Савеза здравствених радника Србије и др.

Члан лекарске коморе и акредитован у својој струци (број лиценце 1000691/2009).

Члан више струковних организација: Европског удружења трансфузиолога (ИСБТ); СЛД-а, Трансфузиолошке секције, Удружења АРТ, Удружења лабораторијских техничара Србије, Савеза здравствених радника Србије.



Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом
**"ПРЕДНОСТИ УПОТРЕБЕ БИОТЕХНОЛОШКОГ ПОСТУПКА ПРОДУКЦИЈЕ
ИНТЕРФЕРОНА-ГАМА ИЗ ПРЕЧИШЋЕНЕ СУСПЕНЗИЈЕ ХУМАНИХ
ЛЕУКОЦИТА"**

која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, _____

Аутор дисертације: **Прим. мр сц. мед. Братислав Станковић**

Потпис аутора дисертације:

Братислав Станковић



Прилог 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ
ОБЛИКА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Име и презиме аутора: **Братислав Станковић**

Наслов дисертације:

**"ПРЕДНОСТИ УПОТРЕБЕ БИОТЕХНОЛОШКОГ ПОСТУПКА ПРОДУКЦИЈЕ
ИНТЕРФЕРОНА-ГАМА ИЗ ПРЕЧИШЋЕНЕ СУСПЕНЗИЈЕ ХУМАНИХ
ЛЕУКОЦИТА"**

Ментор: **Проф. др Борислав Каменов**

Изјављујем да је штампани облик моје докторске дисертације истоветан електронском облику, који сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

Братислав Станковић



Прилог 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

**"ПРЕДНОСТИ УПОТРЕБЕ БИОТЕХНОЛОШКОГ ПОСТУПКА ПРОДУКЦИЈЕ
ИНТЕРФЕРОНА-ГАМА ИЗ ПРЕЧИШЋЕНЕ СУСПЕНЗИЈЕ ХУМАНИХ
ЛЕУКОЦИТА"**

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да подвучете само једну од шест понуђених лиценци; опис лиценци дат је у Упутству).

У Нишу, _____

Аутор дисертације: **Прим. мр сц. мед. Братислав Станковић**

Потпис аутора дисертације:

Братислав Станковић
