

# РОСЛИННІ СИСТЕМИ ЯК ПЛАТФОРМИ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ІНТЕРФЕРОНА АЛЬФА ТА ЙОГО ВИКОРИСТАННЯ

О. ОВЧАРЕНКО<sup>1,3</sup>, В. РУДАС<sup>1</sup>, Н. ЖОЛОБАК<sup>2</sup>, М. КУЧУК<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, 03143, Україна

<sup>2</sup> Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03680, Україна

<sup>3</sup> Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»,  
проспект Берестейський, 37, Київ, 03056, Україна

Автор для кореспонденції: О. Овчаренко, e-mail: ovcharenkooo77@gmail.com

*Інтерферон альфа (ІФН) – це невеликий глікозильований поліпептид, який використовується для лікування раку, імунних розладів та інших захворювань. Потреби медицини та ветеринарії в безпечних джерелах цього препарату спонукають до пошуку нових систем виробництва інтерферону. Рослини, що експресують ІФН, можуть стати чудовою заміною традиційним бактеріальним системам. Серед переваг рослинного людського ІФН – правильне глікозилювання, відсутність токсинів і патогенних мікроорганізмів, а також невисока собівартість виробництва. Проведено порівняння ефективності різних рослинних систем для виробництва ІФН. Пероральне застосування ІФН, отриманого з їстівних рослин, є перспективним напрямком через відсутність потреби в очищенні білка, ефективне збереження та безпечний спосіб його доставки до компетентних тканин організму-реципієнта. Обговорюються переваги їстівних рослин як біофортифікованих векторів для доставки інтерферону. Порівнюються приклади перорального застосування ІФН, продукованого у різних системах, в тому числі і рослинних. Розглянуто факти перорального застосування у ветеринарії людського ІФН з різних експресійних систем.*

**Ключові слова:** молекулярне фермерство, фармацевтичний білок, рекомбінантний інтерферон людини  $\alpha$ -2b, пероральне застосування, їстівна рослина, трансгенні рослини.

**Вступ.** Інтерферон альфа людини (ІФН-альфа) – невеликий глікозильований білок (Adolf et al., 1991), який належить до сімейства інтерферонів I типу, що складається з білків з множинними біологічними ефектами, включаючи антивірусну, антипроліферативну та імуномодулюючу дію (Seaglio et al., 2010; Meyts, Casanova, 2021). Серед інших форм ІФН, людський ІФН альфа-2b використовується в ме-

дицині для лікування таких вірусних захворювань, як COVID-19, гепатит, ВІЛ, ВПЛ та деяких форм раку (Ryff, 1993; Verhaar-Langereis et al., 2000; Ozgur, 2003; Morisco et al., 2004; Liu et al., 2009; Pereda et al., 2020; Zarochentseva et al., 2020; Papasavvas et al., 2021; Ye et al., 2021; Cao et al., 2022; Gherlan et al., 2024). Клінічне застосування цього цитокіну обмежене високою вартістю виробництва та/або потенційною контамінацією клітин ссавців патогенами людини і тварин (Sirko et al., 2011, Buyel et al., 2018).

Рослинні платформи успішно застосовуються впродовж останніх десятиліть для ефективного виробництва фармацевтичних білків (Sirko et al., 2011; Dirisala et al., 2017; Chen, 2018; Gunasekaran, Gothandam, 2020; Cao et al., 2022). Переваги рослинних виробничих систем для отримання рекомбінантних фармацевтичних білків обговорюються в ряді оглядів (Ma et al., 2003; Kwon, Daniell, 2016; Dirisala et al., 2017; Merlin et al., 2017; Buyel, 2018; Chen, 2018; Kulshreshtha, Mandadi, 2024). У контексті біофармацевтичного виробництва перевагами систем рослинного походження є можливість синтезувати складні білки з автентичними посттрансляційними модифікаціями (наприклад, глікозилювання, утворення дисульфідних зв'язків) у поєднанні з низькою вартістю виробництва, безпекою процесу, що ґрунтується на нездатності патогенних мікроорганізмів людини реплікуватися в рослинах, а також їх потенціалом для великомасштабного виробництва. Останні два аспекти особливо важливі, якщо порівнювати рослини з клітинами ссавців, оскільки перші не заражені небезпечними для людини патогенами, а виробничі потужності можуть бути швидко адапто-

вані до потреб ринку. В огляді Sack та ін. (2015) згадується ряд вже комерціалізованих продуктів, вироблених у рослинах.

Хоча, здебільшого, вважається, що активність ІФН є видоспецифічною (Meigan, 1964), пероральна терапія поросят натуральним людським ІФН альфа модулювала природний перебіг високої захворюваності та смертності, що зазвичай спостерігається при трансмісивному гастроентериті (Cummins et al., 1995). Людський ІФН альфа був успішно випробуваний у ветеринарії для лікування імуноопосередкованого кератокон'юнктивіту (Gilger et al., 1999), ідіопатичної рецидивуючої поверхневої піодермії у собак (Thompson et al., 2004); котів, природно інфікованих вірусами лейкемії котів (FeLV) та імунодефіциту котів (FIV) (Gomez-Lucia, et al., 2019), а також проти вірусу діареї великої рогатої худоби (Elsheikh et al., 2019). Альфа-ІФН людини посилював системні антибактеріальні захисні реакції у мишей, захищаючи їх від *Listeria monocytogenes* (Ohya et al., 2005). Таким чином, як медицина, так і ветеринарія зацікавлені у застосуванні цього ІФН з терапевтичною метою.

У цьому огляді ми порівнюємо ефективність різних рослинних систем для виробництва ІФН. Основна увага приділяється системам на основі їстівних рослин. Обговорюється потенціал перорального застосування та використання таких, продукованих у рослинах, ІФН у ветеринарії.

### Виробництво інтерферону в рослинних системах

Виробництво інтерферону в рослинах може бути досягнуто шляхом введення генів в ядра рослин за допомогою генетичної трансформації, в пластиди за допомогою трансформації пластома або шляхом транз'єнтно́ї експресії в рослинах. Антивірусна активність ІФН, отриманого на різних рослинних експресійних платформах, представлена в табл. 1 і 2. Кожен з цих підходів має свої переваги та недоліки.

Накопичення рекомбінантного білка за допомогою транз'єнтно́ї експресії, порівняно зі стабільною трансформацією, є вищим і може досягати до 9 % від загального розчинного білка (Sindarovska, Kuchuk, 2024). Існує помітна різниця між господарями за здатністю

продувати рекомбінантні білки. Оскільки для транз'єнтно́ї експресії найчастіше використовують багаті на алкалоїди різні види тютюну, отримані білки мають бути ретельно очищені. Інші види, наприклад, їстівний солодкий базилік, демонструють значно нижчий рівень накопичення рекомбінантних білків. Транз'єнтно́ї біосинтез білка в рослинах для отримання HuIFN- $\alpha$  2b за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованих експресійних векторів на основі елементів геному X вірусу картоплі (PVX), що несуть ген *inf- $\alpha$  2b*, відрізнявся у таких видів, як *Nicotiana benthamiana* і *Ocimum basilicum*, до 50–60 разів (Sindarovska, Kuchuk, 2024). Кількість HuIFN, отриманого в рослинах базиліка після використання системи переносу з клітини в клітину на основі PVX, була подібною до кількості HuINF, отриманого в *N. benthamiana* після використання простої системи, де ген *inf- $\alpha$  2b* контролювався 35S промотором вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV). Система поширення вірусу від клітини до клітини для транз'єнтно́ї експресії видається найефективнішою серед протестованих (Chen, 2018). Віруси, що інфікують рослини, можуть бути сконструйовані для експресії генів багатьох моноклональних антитіл, вакцин та інших терапевтичних білків у рослинних тканинах. Їх використання не потребує постійної трансгенної експресії, що дозволяє виробляти терапевтичні білки у великих кількостях за короткий період та уникати метаболічного перевантаження рослин-господарів (Kulshreshtha, Mandadi, 2024). Проте використання великої кількості агробактерій або вірусних векторів, що поширюються від клітини до клітини, під час промислової транз'єнтно́ї експресії може викликати певні проблеми з біобезпекою.

Кількість рекомбінантного білка, синтезованого транспластомними рослинами, є досить високою і може бути порівняною з тією, що досягається при транз'єнтно́ї експресії, але трансформація пластома є досить складною (Kuchuk, 2007, 2017). Стабільну сайт-специфічну інтеграцію гена *IFN- $\alpha$  2b* в геном хлоропластів, стабільність експресії впродовж кількох поколінь та гомопластичність транспластомних рослин продемонстрували Arlen et al. (2007). Вміст HuIFN  $\alpha$ -2b досягав до 20 %

від загального розчинного білка або 3 мг на 1 г сирової маси листя, що свідчить про перспективність експресії гена *HuIFN- $\alpha$  2b* в хлоропластах тютюну (Arlen et al., 2007). Незважаючи на такі високі результати експресії у хлоропластах тютюну гена *HuIFN- $\alpha$  2b*, результати трансформації пластома з геном, що кодує іншого представника родини інтерферонів –  $\gamma$ -ІФН, виявилися не такими помітними. Кількість рекомбінантного білка  $\gamma$ -ІФН варіювала від 0,42 % (Razmi et al., 2019) до 6 % (Leelavathi and Reddy, 2003). У нашій лабораторії експресія *HuIFN $\alpha$ -2b* у пластомі тютюну була нижчою, ніж у Arlen et al. (2007), ймовірно, через різні регуляторні елементи (Rudas et al., 2024). Ко-експресія в хлоропластах тютюну гена *HuIFN- $\alpha$  2b* і злитих генів *esxA* і *fbpB<sup>ATMD</sup>*, які кодують білок Esat Ag 6, що індуюють імунну відповідь на *Mycobacterium tuberculosis*, знижувала активність HuIFN- $\alpha$  2b.

Стабільної генетичної трансформації та експресії гена HuIFN- $\alpha$  2b можна досягти в модельних видах-господарях (таких як тютюн) та в їстівних рослинах. На даний час FDA схвалив застосування рослинних клітин для економічно ефективного виробництва білкових препаратів (БП) у великомасштабних гідропонних установках для вирощування, що відповідають сучасним вимогам належної виробничої практики (сGMP). У ліофілізованих рослинних клітинах БП стабільні при температурі навколишнього середовища впродовж декількох років, зберігаючи свою форму та ефективність. Біоінкапсульовані в клітини їстівних рослин білки БП захищені від руйнування в шлунку, в той час як мікробіота кишечника вивільняє їх у цільовому місці. Велика площа слизової оболонки кишечника людини є ідеальною системою для пероральної доставки ліків. Мітки (рецептор-зв'язуючі білки або пептиди, що проникають у клітини) прикріплені до БП, дозволяють прослідкувати як вони ефективно проникають через кишковий епітелій і доставляються до кровоносної або імунної системи (Kwon, Daniell, 2016). Таким чином, біоінкапсуляція ІФН може стати ефективним методом його доставки до компетентних тканин пацієнта. Серед переваг рослинних продуктивних систем є той факт, що – коли для експресії цільових білків використовуються ор-

гани рослин – для зберігання і транспортування трансгенних клітин не потрібен холододовий ланцюг (Fukuzava et al., 2010).

В таких їстівних рослинах, як салат, картопля, яска, морква, алое, топінамбур, помідор, редька (Ohya et al. 2001, 2005; De Leede 2007; Song et al., 2008; Luchakivskaya et al., 2011; Lowther et al., 2012, Maistrenko et al., 2015, Yaroshko et al., 2021, Kebeish et al., 2022), вже отримана експресія HuIFN- $\alpha$  2b. Повний перелік досліджених трансгенних ІФН-вмісних рослин-хазяїв, генетичних регуляторних елементів, тканин і органів та досягнутої ними активності наведено в табл. 2. Для генетичної трансформації рослин у більшості випадків використовували вектори з рекомбінантним геном *HuIFN- $\alpha$  2b*, злитим з калретикуліновим сигналом апопластичного таргетингу з *Nicotiana plumbaginifolia*, під контролем промотора 35S CaMV, як зазначено в табл. 2. Цей сигнал спрямовував потрібний білок до апарату Гольджі, ендоплазматичного ретикулулу, плазматичних мембран та клітинних стінок (Borisjuk et al., 1998, 1999). Переважна апопластична локалізація досліджуваного білка поза цитоплазмою захищає його від дії рослинних клітинних протеаз. Виявлена при стабільній генетичній трансформації активність ІФН була достатньою і порівнянною з терапевтичними дозами.

У більшості випадків біологічна активність рекомбінантного рослинного HuIFN- $\alpha$  2b була підтверджена лише *in vitro* щодо вірусних цитопатичних ефектів на клітини тварин і людини (див. табл. 1–2), а також вивчалася протипухлинна дія (Arlen et al., 2007; Nidoieva et al., 2019; Kebeish et al., 2022). У деяких випадках активність HuIFN- $\alpha$  2b рослинного походження перевіряли і на мишачих моделях (Ohya et al., 2005; Arlen et al., 2007; Ovcharenko et al., 2024).

Вплив синтезованого в рослинах рекомбінантного HuIFN- $\alpha$  2b на репаративний фермент людини Об-метилгуанін-ДНК-метилтрансферазу (MGMT) у клітинах як ракового, так і неракового походження досліджували Nidoieva et al. (2019). За допомогою вестерн-блот-аналізу дослідники визначали кількість MGMT у ракових клітинах Нер-2 (епідермоїдна карцинома гортані) та неракових клітинах Е8 (отриманих з клітин зародкової лінії), які обробляли очищеним рекомбінантним HuIFN- $\alpha$  2b у без-

сироватковому середовищі. Інгібуючий ефект рекомбінантного ІФН був більш показовим у ракових клітинах порівняно з нераковими (Nidoieva et al., 2019).

Оцінено вплив рекомбінантного білка HuIFN- $\alpha$  2a, що продукується трансгенними рослинами білої та червоної редьки *Raphanus sativus* L., на ріст клітинної лінії пухлини людини Нер-G2 (гепатоцелюлярна карцинома людини) *in vitro*. Так, значення IC<sub>50</sub> білкових екстрактів білої та червоної трансгенної редьки перевищували протипухлинну активність порівняно з білковими екстрактами, отриманими із дикої редьки в ~60 разів та ~43 рази відповідно. Значення IC<sub>50</sub>, зареєстровані для рекомбінантного білка HuIFN- $\alpha$  2b з редьки, були порівнянними зі значеннями, зареєст-

рованими для комерційно доступного Рег-IFN. Цей результат продемонстрував функціональність рекомбінантного HuIFN- $\alpha$  2b, що продукується в трансгенних рослинах редьки, проти росту пухлинних клітин Нер-G2 (Kebeish et al., 2022). У цьому ж дослідженні визначали й апоптоз клітин Нер-G2 після обробки культури клітин екстрактами трансгенної редьки, що експресує ІФН. Автори виявили, що вплив екстрактів з білої та червоної трансгенної редьки *Raphanus sativus* L. на апоптоз у культурі клітин Нер-G2 відрізнявся (Kebeish et al., 2022).

Таким чином, експресія *HuIFN- $\alpha$  2b* в різних рослинних системах довела свою ефективність шляхом продукування достатньої кількості білка з високою біологічною актив-

Таблиця 1. Антивірусна активність транз'єнтно експресованого *HuIFN- $\alpha$*  на різних рослинних платформах

Вид рослини господаря	Інтерферон	Регуляторні елементи	Досліджувані тканини та органи	Активність, $\times 10^3$ МО/г СВ	Посилання
<i>Транз'єнтна експресія за допомогою агроінфільтрації з простою експресійною касетою</i>					
Салат латук ( <i>Lactuca sativa</i> )	<i>ChIFN-<math>\alpha</math> 2b</i>	p35S, cal	Листки	0,82 $\times 10^3$ МО/мг	Song et al., 2008
	<i>HuIFN-<math>\beta</math></i>	p35S, cal	Листки	ЗРБ 31,00	Li et al., 2007
<i>Nicotiana excelsior</i>	<i>HuIFN-<math>\alpha</math> 2b</i>	p35S	Листки	0,13 $\pm$ 0,06	Sindarovska et al., 2010
		p35S, cal	Листки	2,06 $\pm$ 0,78	
<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>HuIFN-<math>\alpha</math> 2b</i>	p35S	Листки	4,00	Kosobokova et al., 2016
<i>Nicotiana cavicola</i>	<i>HuIFN-<math>\alpha</math> 2b</i>	p35S, cal	Листки	0,77–1,57	Sindarovska et al., 2019
		Вірусний субгеномний промотор, інтрон	Листки	0,80–2,40	
<i>Транз'єнтна експресія за допомогою агроінфільтрації з вірусною експресійною касетою</i>					
Базилік ( <i>Ocimum basilicum</i> )	<i>HuIFN-<math>\alpha</math> 2b</i>	Експресійна касета на основі PVX	Листки	НВ, <i>HuIFN-<math>\alpha</math> 2b</i> концентрація до 0,012 мг/г СВ	Sindarovska, Kuchuk, 2024
<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>HuIFN-<math>\alpha</math> 2b</i>	Експресійна касета на основі PVX	Листки	НВ, <i>HuIFN-<math>\alpha</math> 2b</i> концентрація до 1,2 мг/г СВ	Sindarovska, Kuchuk, 2024

*Примітка.* p35S – 35S промотор вірусу мозаїки цвітної капусти, cal – кальретикуліновий сигнал апопластного таргетингу з *Nicotiana plumbagenifolia*, НВ – не вивчали, PVX – X вірус картоплі (Potato virus X), ЗРБ – загальний розчинний білок, СВ – сира вага.

Таблиця 2. Антивірусна активність *HuIFN-α*, отриманого на різних рослинних експресійних платформах (ядерна та пластомна трансформація)

Вид рослини господаря	Інтерферон	Регуляторні елементи	Досліджувані тканини та органи	Активність, ×10 <sup>3</sup> МО/г СВ	Посилання
<i>Ядерний геном</i>					
Картопля ( <i>Solanum tuberosum</i> )	<i>HuIFN-α 8</i>	p35S	Листки	0,21–0,56	Ohya et al., 2001
Рис ( <i>Oryza sativa</i> )	<i>IFN-α</i>	35S	Насіння, що розвивається	15,00–46,00	Masumura et al., 2006
Ряска ( <i>Lemna minor</i> )	<i>HuIFN-α 2b</i>	–	Листеці	0,04–19,30 МО/мг ЗРБ	Stomp et al., 2012
Морква ( <i>Daucus carota</i> )	<i>HuIFN-α 2b</i>	p35S, cal	Листки Корені	9,60–50,70 1,47–12,20	Luchakivskaya et al., 2011
		pMII, cal	Листки Корені	6,40–50,70 2,98–16,50	
Алое ( <i>Aloe vera</i> )	<i>HuIFN-α 2b</i>	pZU	Шкірка та м'якоть листків	0,13–5,02	Lowther et al., 2012
Салат ендивій ( <i>Cichorium intibum</i> )	<i>HuIFN-α 2b</i>	p35S, cal	Листки	0,00–9,30	Matvieieva et al., 2012
		pMII, cal	Листки Корені	0,00–0,29 1,62–2,25	
			Листки Корені	0,00 2,25–5,40	
Салат латук ( <i>Lactuca sativa</i> )	<i>HuIFN-α 2b</i>	pMII, cal	Листки Корені	0,00 2,25–5,40	
Ріпак ( <i>Brassica napus</i> )	<i>HuIFN-α 2b</i>	p35S, cal	Листки	0,50–2,25	Sakhno et al., 2012
Топінамбур ( <i>Helianthus tuberosus</i> )	<i>HuIFN-α 2b</i>	p35S, cal	Корені, калюс, пагони	2,00–54,50	Maistrenko, et al., 2015
Тютюн ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	<i>HuIFN-α 2b</i>	p35S, cal	Листки	3,27–6,31	Potrokhov, et al., 2017
Помідор ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	<i>HuIFN-α 2b</i>	p35S, cal	Листки	До 86,43	Yaroshko et al., 2021
			Плоди	До 7,26	
Редис ( <i>Raphanus sativus</i> )	<i>HuIFN-α 2b</i>	CaMV p35SS, 3' UTR of CaMV (pA35S)	Листки	НВ	Kebeish et al., 2022
<i>Пластом</i>					
Тютюн ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	<i>HuIFN-α 2b</i>	промотор оперона пластидної рРНК	Листки	20 % of ЗРБ	Arlen et al., 2007
		psa A/B	Листки	43,20	Rudas et al., 2024

Примітка. p35S – 35S промотор вірусу мозаїки цвітної капусти, pMII – коренеспецифічний промотор MII, cal – кальретикуліновий сигнал апопластного таргетингу з *Nicotiana plumbagenifolia*, pZU – промотор убіквітину кукурудзи, pArabAct2 – промотор актину арабідопсису, ЗРБ – загальний розчинний білок.

ністю. Трансгенні рослини, що експресують ІФН, продемонстрували потенційну користь як антивірусні та протипухлинні агенти, представляючи собою перспективну біосистему для виробництва функціонально активного HuIFN- $\alpha$ .

### Вплив ІФН на ріст і розвиток рослин

Рекомбінантні білки, синтезовані в рослинах за допомогою молекулярного фермерства, повинні бути нешкідливими або принаймні індиферентними для рослинного організму. Гени шкідливих для рослин білків, які ушкоджують клітини рослин або сповільнюють ріст рослин і, таким чином, перешкоджають адекватному накопиченню цільового білка і біомаси, не підходять для ефективного молекулярного фермерства. Було отримано велику кількість трансгенних рослин, що експресують інтерферон, але було проведено лише кілька досліджень для визначення впливу цього білка на рослини.

Відтерміновані відповіді ряду ІФН-експресуючих ліній «бородатих» коренів *Althaea officinalis* L. на вплив короточасних холодових та високотемпературних стресових факторів вивчали Matvieieva et al. (2021). Результати, отримані в цьому дослідженні, показали, що чутливість до короточасних температурних стресових впливів у «бородатих» коренів різних ліній *A. officinalis* (індивідуальні трансформаційні події) відрізнялися незалежно від векторів трансформації або наявності гена *HuIFN- $\alpha$  2b*. Це означає, що експресія ІФН не була наріжним каменем, який кардинально впливав на життєздатність отриманих ліній «бородатих» коренів (Matvieieva et al., 2021).

Potrokhov et al. (2014) вивчали відповіді на інфікування вірусом тютюнової мозаїки (TMV) трансгенних рослин тютюну, які експресували HuIFN і виявили захисну антивірусну ІФН-подібну активність (3–6 312 МО/г сирої маси) у культурі ембріональних клітин тестикул поросят (ЕРТ), інфікованих вірусом везикулярного стоматиту (VSV). За допомогою електронної мікроскопії не виявлено суттєвих відмінностей в ультраструктурі клітин трансгенних та контрольних рослин тютюну (Potrokhov et al., 2014).

Процес диференціації адвентивних коренів *Lotus japonicus*, трансформованих *ChIFN- $\alpha$* , вив-

чали за допомогою ідентифікації трансгену, виявлення індолілоцтової кислоти (ІОК), секвенування РНК (RNA-Seq) та ряду інших методів. Встановлено, що експресія *ChIFN- $\alpha$*  сприяла розвитку додаткових коренів, відповіді у вигляді синтезу індолілмасляної кислоти (ІМК) та інших ауксинових сполук. Подальші дослідження показали, що *ChIFN- $\alpha$*  впливає на регулятори експресії, залучені до посилення синтезу та сигналізації ауксинів, трансформуючи транспортні процеси. Автори припускають, що молекулярні регуляторні механізми *ChIFN- $\alpha$*  у *L. japonicus* можуть стати орієнтиром у селекційному покращенні кормових трав (Wei et al., 2023).

Нашою лабораторією, як в умовах *in vitro*, так і в умовах закритого ґрунту, було проведено оцінку морфологічних особливостей першого та другого поколінь рослин томатів сорту Шедевр 1, трансформованих конструкцією pCB 124, що містить ген *HuIFN- $\alpha$  2b* та ген селективної неоміцинфосфотрансферази (*npt II*). Аналізували рослини першого покоління трьох незалежних трансгенних клонів, а також рослини другого покоління. Трансгенні рослини порівнювали з вихідними нетрансгенними рослинами томатів сорту Шедевр 1. Згідно з отриманими результатами, не було виявлено жодних морфологічних відмінностей між трансгенними та вихідними нетрансгенними рослинами томатів. Наші результати відрізняються від результатів, отриманих в роботі (Wei et al., 2023). Таким чином, якщо і був якийсь вплив ІФН на наші рослини як виробничу систему, то він був незначним і суттєво не впливав на ріст і розвиток рослин, а також на накопичення білка, що нас цікавить.

### Перспективи використання ІФН рослинного походження

Як медицина, так і ветеринарія потребують дешевих джерел інтерферону для терапії широкого спектру захворювань (Abu-Zeinah et al 2021; Frazzini et al, 2021; Gao et al., 2021; Jiao et al., 2023; Martabano et al., 2024). Деякі віруси (наприклад, ентеропатогенні коронавіруси) можуть значно пригнічувати в інфікованих Пейєрових пляшках експресію мРНК *IFN- $\alpha$* , гена, що бере участь у модуляції імунної відповіді хазяїна, (Xu et al., 2020), таким чином

збільшуючи потребу для терапевтичного використання екзогенного ІФН.

Хоча інтерферони вважаються видоспецифічними (Merigan, 1964), було проведено низку експериментів для оцінки терапевтичної активності очищеного HuIFN- $\alpha$  на тваринах. Цілі цих досліджень були різними і пов'язані або з медициною в рамках вивчення захворювань людини на тваринних моделях (Meys, Casanova, 2021; Bessière et al., 2021), або з ветеринарними дослідженнями, пов'язаними з терапією інфекцій у тварин (Cummins et al., 1995; Gilger et al., 1999; Thompson., 2004; Gomez-Lucia E, et al., 2019; Watanuki et al., 2009; Ito et al., 2020; Frazzini et al, 2021). Вважається, що через взаємодію з іншими цитокінами та їх рецепторами HuIFN- $\alpha$  може проявляти потенційні імунотимулюючі ефекти (Watanuki et al., 2009).

Лікування поросят 20,0 МО HuIFN- $\alpha$  забезпечило, порівняно з поросятами, які отримували плацебо, значно вищий рівень виживання після інфікування (Cummins et al., 1995).

Пероральне застосування низьких доз HuIFN- $\alpha$  собакам, які страждають на імуніопосередкований серозний кератокон'юнктивіт, призвело до сприятливої реакції у 55 % всіх собак, які отримували лікування, без побічних ефектів (Gilger et al., 1999). Хоча інше пілотне дослідження, в якому HuIFN- $\alpha$  тестували для лікування ідіопатичної рецидивуючої поверхневої піодермії у собак, показало, що пероральне застосування ІФН- $\alpha$  2b в дозі 1000 МО/мл/добу забезпечує лише тимчасове полегшення при цьому захворюванні (Thompson et al., 2004).

Результати, отримані після перорального лікування рекомбінантним HuIFN- $\alpha$  (rHuIFN- $\alpha$ ) (1 мл/добу по 60 МО/мл почергово впродовж чотирьох місяців) котів, інфікованих вірусом лейкемії котів (FeLV) та вірусом імунodefіциту котів (FIV), показали, що rHuIFN- $\alpha$  може бути хорошим кандидатом для лікування котів, інфікованих FeLV. Лікування котів rHuIFN- $\alpha$  помітно покращило клінічний стан, незалежно від початкової тяжкості захворювання (Gomez-Lucia et al., 2019). Ефект, який тривав впродовж усього дослідження у більшості тварин, помітно покращував їх клінічний стан. Пероральне лікування rHuIFN- $\alpha$  може бути цікавою альтернативою для терапії котів, інфікованих

FeLV та FIV, головним чином через його низьку токсичність, відносно низьку вартість та простоту перорального застосування порівняно з ін'єкційним протоколом для інших сполук, що полегшує його застосування власником у домашніх умовах (Gomez-Lucia E, et al., 2019).

Існують суперечливі дані щодо впливу HuIFN- $\alpha$  на риб. Пероральне введення низької дози HuIFN- $\alpha$  коропам значно підвищувало фагоцитарну активність у нирках, а також демонструвало значну регуляцію експресії генів цитокінів (Watanuki et al., 2009). В той час в експериментах Fukuzava et al. (2010) HuIFN- $\alpha$  не збільшував виживання лосося.

Таким чином, пероральне застосування фармацевтичних препаратів HuIFN у більшості випадків демонструвало фізіологічну активність при лікуванні тварин.

Безпечне виробництво фармацевтичних білків на основі рослин завдяки відсутності певних шкідливих речовин (пірогенів, патогенів людини і тварин) та можливості отримання білків з бажаними посттрансляційними модифікаціями, економічній доцільності, швидкому масштабуванню та вищій стабільності рекомбінантних білків стало прийнятною альтернативою традиційним платформам для експресії (Gunasekaran, Gothandam, 2020).

Парентеральна терапія очищеним ІФН асоціюється з добре описаними побічними ефектами, такими як втома, грипоподібні симптоми, анемія, нейтропенія, тромбоцитопенія та психіатричні симптоми, які можуть вимагати припинення терапії або модифікації дози (Fried, 2002; Bagheri et al., 2004; Morisco et al., 2004; Hindi, Saleh, 2018; Ye et al., 2021; Lai et al., 2023). Пероральне застосування очищеного протеїну вважалося неоднозначним через деструктивну дію протеаз шлунка. Вихід був знайдений шляхом розробки ліпосомальних форм лікарських засобів, які вже досить широко застосовуються в медицині (Vulbake et al., 2017; Lu et al., 2019). Досліджені та розроблені ліпосомальні форми ІФН були використані для лікування пухлинних патологій, зокрема легень, печінки, шлунково-кишкового тракту (Li, F. et al. 2012; Alhawamdeh, M. et al., 2021). Але для ліпосомальних форм, окрім необхідності додаткових стадій виробництва для отримання ліпосомальних структур з активним

ІФН у визначеній дозі, висуваються ті ж вимоги, що і для ін'єкційних форм ІФН.

Ректальне застосування ІФН є високоефективним завдяки особливостям метаболічних процесів у прямій кишці. Вона має гладку внутрішню поверхню, а венозний відтік відбувається безпосередньо в нижню порожнисту вену великого кола кровообігу, минаючи ворітну вену і печінку. Саме ця особливість використовується при введенні ліків через пряму кишку (Hua S., 2019). Серед препаратів ІФН у формі супозиторіїв лише в Україні представлені Альфарецин («Валартінфарма»), Вітаферон («Інтерфармбіотек») та Лаферобіонум® (STADA). Насправді, ректальне введення ІФН викликає менше побічних ефектів (Vlatkovic et al., 1979; Bocsi, 1984).

Перевагою біоінкапсульованого в рослинні клітини ІФН є його недоступність (захист) для ферментів організму і можливість вивільнення ІФН саме в ректальній частині кишечника завдяки розщепленню рослинної клітковини дружньою мікробіотою організму. Таким чином, товста кишка може бути корисною для введення біоінкапсульованого в рослинні клітини ІФН з подальшим вивільненням його мікробіомом кишечника в місці призначення. Знання ефективності накопичення ІФН у рослинних клітинах дозволяє визначити необхідні дози біологічно активної речовини, що не потребує складних етапів очищення, стерилізації чи пакування. Біоінкапсульований в рослинні клітини ІФН не вимагає суворого дотримання холодового ланцюга і може зберігатися в природному вигляді місяцями. Важливо, що за умов вирощування таких рослин в теплиці готовий продукт може потрапляти до «споживача» цілий рік.

Крім того, вторинні метаболіти рослин можуть зменшувати побічні ефекти навіть при застосуванні високих доз ІФН завдяки антиоксидантам та деяким іншим властивостям (наприклад, стероїдний алкалоїд з *Solanum nigrum*) (Morisco et al., 2004; Zhao et al., 2018). Отже, однією з переваг перорального застосування ІФН, вироблених у рослинних системах, є додаткова присутність у рослинах біологічно активних вторинних метаболітів. Ці речовини можуть потенціювати активність ІФН, знижуючи мінімальну захисну дозу ІФН рослин-

ного походження порівняно з очищеним ІФН (Ohya et al., 2005). При пероральному застосуванні білкові препарати, біоінкапсульовані в рослинних клітинах, захищені в шлунку від дії кислот і ферментів, але згодом вивільнюються в просвіт нижніх відділів кишечника під дією мікробів, які перетравлюють клітинну стінку рослин (Kwon, Daniell, 2016). Більше того, було виявлено, що в гіперглікозилюваному стані цей білок має в 25 разів довший період напіврозпаду в плазмі, ніж неглікозилюваний рекомбінантний HuIFN- $\alpha$ 2b (Ceaglio et al., 2010), тоді як глікозилювання характерне для рослин, але не для бактерій як продуктивних систем.

Захисну дію пероральних рослинних екстрактів з ІФН- $\alpha$ , експресованим у трансгенній картоплі, досліджували на мишах, інфікованих *Listeria monocytogenes*. Встановлено, що захисна концентрація ІФН у рослинних екстрактах була в 50 разів нижчою порівняно з очищеним ІФН людини. Набагато нижча концентрація ІФН (20 МО/20 мкл) в рослинних екстрактах забезпечувала такий же захист, як і суттєво вищі концентрації очищеного ІФН людини (1000 МО/20 мкл). Це підтвердило, що трансгенні рослини, які експресують цитокіни, можна використовувати профілактично як істивні лікарські засоби для посилення системних захисних реакцій у людей і тварин (Ohya et al., 2005).

Іто та ін. використовували ІФН з рослин полуниці для лікування собак з хронічним рецидивуючим зовнішнім отитом (Ito et al., 2020). Ліофілізований порошок з трансгенної полуниці, що експресує ІФН- $\alpha$  собаки, вводили двічі на тиждень собакам досліджуваної групи з хронічним рецидивуючим зовнішнім отитом шляхом аплікації на ясна перед годуванням. Застосовували 2 500 МО/голову/добу щодня впродовж 21 дня поспіль. Було доведено протизапальний ефект при хронічному рецидивуючому зовнішньому отиті. Після нанесення досліджуваного препарату на ясна в досліджуваній групі виявлене значне полегшення симптомів порівняно з контрольною групою, у якої препарат не застосовували. Тенденція до одужання спостерігалася з 9-го дня після початку застосування, а клінічна оцінка суттєво відрізнялася на 14-й день після початку застосування порівняно з групою, яка

не отримувала лікування (Ito et al., 2020).

Виробництво інтерферону в томатах може мати деякі переваги порівняно з іншими, ранніми рослинними платформами. Плоди томатів не мають шкідливих вторинних метаболітів, як листя картоплі або різні види тютюнів. Каротиноїди були запропоновані як хороше джерело антиоксидантів, і деякі дослідження припускають, що споживання фруктів і овочів є більш ефективним, ніж споживання чистих сполук, зумовлене взаємодією і синергізмом, що покращує їх біодоступність (Beecher et al., 1998). Такий вторинний метаболіт томатів, як лікопін, є каротиноїдом групи провітамінів А і потужним антиоксидантом. Лікопін має вдвічі вищу здатність поглинати синглетний кисень, ніж  $\beta$ -каротин, і в 10 разів вищу, ніж  $\alpha$ -токоферол (вітамін Е). Його здатність знешкоджувати вільні радикали кисню захищає від окислювального пошкодження ДНК як *in vitro*, так і *in vivo*, тим самим запобігаючи потенційним мутаціям, які можуть бути пов'язані з ініціацією та прогресуванням раку. Він може послаблювати пошкодження печінки та запобігати розвитку гепатоцелюлярної карциноми, спричиненої вірусом гепатиту С. Лікопін може підвищити загальний рівень відповіді на антивірусну терапію та затримати прогресування захворювання (Seren et al., 2008).

Людський ІФН- $\gamma$  вже експресували в таких видах томатів, як *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* (Dunal) Dunal (Rudas et al., 1997) та *Lycopersicon esculentum* Mill. (Nazanin et al., 2012).

Трансгенні рослини томатів сорту Шедевр 1, отримані в наших експериментах, мають переваги як ІФН-продукуюча система, що зумовлено особливістю цього сорту: тривалим терміном зберігання, тому висока біологічна активність інтерферону в плодах присутня щонайменше впродовж трьох місяців за умови зберігання при помірній кімнатній температурі. Наступні покоління трансгенних рослин томатів успадкували та успішно експресували ген NuIFN- $\alpha$ 2b (Yaroshko et al., 2021, 2022; Ovcharenko et al., 2024). Визначені значення активності ІФН були представлені вище (табл. 2). Доза комерційного NuIFN- $\alpha$ , яку часто використовують для різних терапевтичних цілей, становить  $1 \times 10^6$  МО, а її еквівалент

може бути забезпечений приблизно 140 г ІФН-експресуючих плодів (м'якоті) томатів.

Morisko et al. (2004) раніше продемонстрували, що комбінація рибавіріну та ІФН, яку використовували для стандартного лікування хронічного гепатиту С, викликає анемію як найчастіший побічний ефект, що призводить до необхідності зниження дози або припинення терапії. Як ІФН, так і рибавірін сприяють розвитку анемії шляхом пригнічення еритропоезу. Рибавірін викликає оборотну гемолітичну анемію, спричинену окислювальним пошкодженням мембрани еритроцитів (Morisco et al., 2004), яку можна зменшити або навіть запобігти за допомогою каротиноїдів. Таким чином, трансгенні рослини томатів, що експресують NuIFN- $\alpha$ , можуть бути гарними кандидатами для лікування гепатиту С як комбіноване джерело істивного ІФН та каротиноїдів.

Згодовування мишам лінії BALB/c томатів, що містять NuIFN, змінювало цитокінові профілі та знижувало летальність серед інфікованих ВВС тварин (Yaroshko et al., 2022; Ovcharenko et al., 2024).

Застосування низьких та високих доз ІФН як в інтактних, так і в інфікованих вірусом тварин проявлялося низкою змін в імунологічних профілях. Відомо, що низькі дози цитокінів мають індуктивний ефект при дії на клітинну популяцію, тоді як високі дози цитокінів часто знижують або пригнічують ефекти біологічної відповіді (Oppenheim and Saklatvala, 1993; Gangur and Oppenheim, 2000; Oppenheim and Feldmann, 2001; Stroud et al., 2001). Отримані дані свідчать про значний протизапальний ефект перорального застосування ІФН-вмісних томатів на тлі генералізованого вірусного інфекційного процесу.

## Висновки

Отримано багатообіцяючі результати генетичної трансформації рослин з геном NuIFN та його успішної експресії в рослинних системах. Як біореактори, рослини можна вважати дешевшими, ніж часто використовувані ферментативні системи на основі *E. coli*, які не здатні до глікозилування, що вимагає посттрансляційних модифікацій для отримання повноцінно активного NuIFN- $\alpha$ . Продукування рослинами фізіологічно активного ІФН людини

і тварин є кроком до задоволення потреб медицини та ветеринарії в безпечному джерелі цього фармацевтично значущого білка. Виробництво ІФН з їстівних рослин може зменшити деякі ризики та занепокоєння, пов'язані з особливостями очищення та зберігання ІФН, а також способами введення цього цитокіну.

**Конфлікт інтересів.** Усі автори заявляють, що не мають конфлікту інтересів щодо публікації цієї статті.

**Фінансування.** Дослідження виконано за рахунок коштів Державного цільового фонду «Наука для безпеки людини і суспільства», грант № 2020.01/0301 «Рослинний біосинтез рекомбінантних фармацевтичних білків, що протидіють широкому розповсюдженню деяких вірусних та бактеріальних інфекцій» та програми 6541230 проекту № 0123U101081 «Синтез рекомбінантних фармацевтичних білків та підвищення вмісту біологічно активних природних сполук у рослинах». Розділ 1. Створення біотехнологічних ліній рослин, що накопичують рекомбінантні фармацевтично цінні білки, зокрема з антибактеріальною (бактеріоцини) та противірусною (інтерферон альфа 2b та грифіцин) активністю. Розробка біотехнологій для підвищення синтезу нативних біологічно активних сполук у лікарських рослинах, які є компонентами медичних препаратів, що використовуються для подолання наслідків військових дій.

#### PLANT SYSTEMS AS PLATFORMS FOR THE PRODUCTION OF INTERFERON ALPHA AND ITS APPLICATION

O. Ovcharenko, N. Zholobak, V. Rudas, M. Kuchuk

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Akademika Zabolotnoho Street, 148, Kyiv, 03143, Ukraine  
Danylo Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Akademika Zabolotnoho Street, 154, Kyiv, 03680, Ukraine

National Technical University of Ukraine «Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute», 37 Beresteisky Avenue, Kyiv, 03056, Ukraine

Interferon alpha (IFN) is a small glycosylated polypeptide used in the treatment of cancer, immune

disorders, and various other related diseases. Demands for human and veterinary medicine in safe sources of this remedy motivate investigations for new interferon production systems. Plants expressing IFN can become an excellent substitution for traditional bacterial systems. Among the advantages of plant-based human IFN are correct glycosylation, lack of toxins and pathogens, and unexpensive production costs. The effectiveness of different plant-based systems for IFN production is compared. Oral administration of IFN produced in edible plants is a promising direction for the lack of demand for purification of the protein, its effective storage, and safe mode of the protein delivery to the competent tissues of a treated organism. The advantages of edible plants as fortified vectors for interferon delivery are discussed. Examples of oral administration of IFN from different production systems (including plant based) are compared. Oral usage of human IFN from various expression systems in veterinary is viewed.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Abu-Zeinah, G., Krichevsky, S., Cruz, T., et al., Interferon-alpha for treating polycythemia vera yields improved myelofibrosis-free and overall survival, *Leukemia*, 2021, vol. 35, no. 9, pp. 2592–2601. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01183-8>
- Adolf, G.R., Kalsner, I., Ahorn, H., et al., Natural human interferon- $\alpha$ 2 is O-glycosylated, *Biochemical J.*, 1991, vol. 276, no. 2, pp. 511–518. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1151121/pdf/biochemj00158-0229.pdf>
- Alhawamdeh, M., Isreb, M., Aziz, A., et al., Interferon- $\gamma$  liposome: a new system to improve drug delivery in the treatment of lung cancer, *ERJ Open Research*, 2021, vol. 3, pp. 00555–2020. <https://doi.org/10.1183/23120541.00555-2020>
- Arlen, P.A., Falconer, R., Cherukumilli, S., et al., Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon- $\alpha$ 2b, *Plant Biotechnol. J.*, 2007, vol. 5, no. 4, pp. 511–525. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00258.x>
- Bagheri, H., Fouladi, A., Barange, K., et al., Follow-up of adverse drug reactions from peginterferon alfa-2b-ribavirin therapy, *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, vol. 24, no. 11, pp. 1546–1553. <https://doi.org/10.1592/phco.24.16.1546.50947>
- Beecher, G.R., Nutrient content of tomatoes and tomato products, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1998, vol. 218, no. 2, pp. 98–100. <https://doi.org/10.3181/00379727-218-44282a>
- Bessi re, P., Wasniewski, M., Picard-Meyer, E., Intra-

- nasal type I interferon treatment is beneficial only when administered before clinical signs onset in the SARS-CoV-2 hamster model, *PLoS pathogens*, 2021, vol. 17, no. 8, e1009427. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009427>
- Bocci, V., Evaluation of routes of administration of interferon in cancer: a review and a proposal, *Cancer Drug Delivery*, 1984, vol. 1, no. 4, pp. 337–351. <https://doi.org/10.1089/cdd.1984.1.337>
- Borisjuk, N.V., Borisjuk, L.G., Logendra, S., et al., Production of recombinant proteins in plant root exudates, *Nature biotechnology*, 1999, vol. 17, no. 5, pp. 466–469. <https://doi.org/10.1038/8643>
- Borisjuk, N., Sitailo, L., Adler, K., et al., Calreticulin expression in plant cells: developmental regulation, tissue specificity and intracellular distribution, *Planta*, 1998, vol. 206, pp. 504–14. <https://doi.org/10.1007/s004250050427>
- Bulbake, U., Doppalapudi, S., Kommineni, N., et al., Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review, *Pharmaceutics*, 2017, vol. 9, no. 2, pp. 12. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012>
- Buyel, J.F., Plants as sources of natural and recombinant anti-cancer agents, *Biotechnology Advances*, 2018, vol. 36, no. 2, pp. 506–20. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.02.002>
- Cao, L., Zhang, L., Zhang, X., et al. Types of interferons and their expression in plant systems. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2022, vol. 42, no. 2, pp. 62–71. <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jir.2021.0148>
- Ceaglio, N., Etcheverrigaray, M., Conradt, H.S., et al., Highly glycosylated human alpha interferon: An insight into a new therapeutic candidate, *J. Biotechnol.*, 2010, vol. 146, no. 1–2, pp. 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.12.020>
- Chen, Q., Recombinant therapeutic molecules produced in plants, In *Advances in Botanical Research*, 2018, vol. 86, pp. 207–244. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2017.11.006>
- Cummins, J.M., Mock, R.E., Shive, B.W., et al., Oral treatment of transmissible gastroenteritis with natural human interferon alpha: a field study, *Veterin. Immunol. Immunopathol.*, 1995, vol. 45, no. 3–4, pp. 355–360. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(94\)05351-R](https://doi.org/10.1016/0165-2427(94)05351-R)
- De Leede, L.G., Humphries, J.E., Bechet, A.C., et al., Novel controlled-release lemna-derived IFN- $\alpha$  2b (locteron): pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability in a phase I clinical trial, *J. Interferon Cytokine Res.*, 2008, vol. 28, no. 2, pp. 113–122. <https://doi.org/10.1089/jir.2007.0073>
- Dirisala, V.R., Nair, R.R., Srirama, K., et al., Recombinant pharmaceutical protein production in plants: unraveling the therapeutic potential of molecular pharming, *Acta Physiologiae Plantarum*, 2017, vol. 39, pp. 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2315-3>
- Ebrahimi, N., Memari, H.R., Ebrahimi, M.A., et al., Cloning, transformation and expression of human gamma interferon gene in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 2012, vol. 26, no. 2, pp. 2925–2929. <https://doi.org/10.5504/BBEQ.2012.0004>
- Elsheikh, A.A., Braun, L.J., Mansour, S.M.G., et al., The effect of human interferon alpha on replication of different bovine viral diarrhea virus strains, *Acta Virologica*, 2019, vol. 63, no. 3, pp. 261–269. [https://doi.org/10.4149/av\\_2019\\_303](https://doi.org/10.4149/av_2019_303)
- Frazzini, S., Riva, F., and Amadori, M., Therapeutic and prophylactic use of oral, low-dose IFNs in species of veterinary interest: back to the future, *Veterinary Sci.*, 2021, vol. 8, no. 6, pp. 109. <https://doi.org/10.3390/vetsci8060109>
- Fried, M.W., Side effects of therapy of hepatitis C and their management, *Hepatology*, 2002, vol. 36, no. S1, pp. S237–S244. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.36810>
- Fukuzawa, N., Tabayashi, N., Okinaka, Y., et al. Production of biologically active Atlantic salmon interferon in transgenic potato and rice plants, *J. Biosci. Bioengineering*, 2010, vol. 110, no. 2, pp. 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.02.005>
- Gangur, V., and Oppenheim, J.J., Are chemokines essential or secondary participants in allergic responses?, *Ann. Allergy, Asthma. Immunol.*, 2000, vol. 84, no. 6, pp. 569–581. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)62403-9](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)62403-9) (Cited from Cummins, J.M., Krakowka, G.S., Thompson, C.G. Systemic effects of interferons after oral administration in animals and humans. *Am. J. Vet. Res.*, 2005, vol. 66, no. 1, pp. 164–176. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.164>)
- Gao, D.M., Yu, H.Y., Zhou, W., et al., Inhibitory effects of recombinant porcine interferon- $\alpha$  on porcine transmissible gastroenteritis virus infections in TGEV-seronegative piglets, *Vet. Microbiol.*, 2021, vol. 252, pp. 108930. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108930>
- Gherlan, G.S., Lazar, S.D., Culinescu, A., et al., Results of response-guided therapy with pegylated interferon Alpha 2a in chronic Hepatitis B and D, *Tropic. Med. Infectious Disease*, 2024, vol. 9, no. 4, pp. 73. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed9040073>
- Gilger, B.C., Rose, P.D., Davidson, M.G., et al., Low-

- dose oral administration of interferon-alpha for the treatment of immune-mediated keratoconjunctivitis sicca in dogs, *J. Interferon Cytokine Res.*, 1999, vol. 19, no. 8, pp. 901–905. <https://doi.org/10.1089/107999099313433>
- Gomez-Lucia, E., Collado, V.M., Miry, G., et al., Follow-up of viral parameters in FeLV-or FIV-naturally infected cats treated orally with low doses of human interferon alpha, *Viruses*, 2019, vol. 11, no. 9, pp. 845. <https://doi.org/10.3390/v11090845>
- Hindi, N.N., Saleh, M.I. Patient characteristics associated with pegylated interferon alfa-2a induced neutropenia in chronic hepatitis C patients, *Clin. Exper. Pharmacol. Physiol.*, 2018, vol. 45, no. 7, pp. 636–642. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12934>
- Hua, S., Physiological and pharmaceutical considerations for rectal drug formulations, *Front. Pharmacol.*, 2019, vol. 10, pp. 1196. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01196>
- Ito, A., Matsumura, T., Gotanda, T., et al., US Patent Application for THERAPEUTIC EFFECT OF ORAL INTERFERON A ADMINISTRATION ON CHRONIC INTRACTABLE EXTERNAL OTITIS U.S. Patent No. 10,799,448B2. 2020 Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. Patent Application (Application #20190029953) <https://patents.google.com/patent/US10799448B2/en>
- Jiao, P., Wang, S., Fan, W., et al., Recombinant porcine interferon cocktail delays the onset and lessens the severity of African swine fever, *Antiviral Res.*, 2023, vol. 215, pp. 105644. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2023.105644>
- Kebeish, R., Hamdy, E., Al-Zoubi, O., et al., A biotechnological approach for the production of pharmaceutically active human interferon- $\alpha$  from *Raphanus sativus* L. plants. *Bioengineering*, 2022, vol. 9, no. 8, pp. 381. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9080381>
- Kosobokova, E.N., Piniugina, M.V., and Kosorukov, V.S. Synthesis of biologically active human interferon  $\alpha$ -2b in *Nicotiana benthamiana*, *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2016, vol. 52, no. 7, pp. 705–713. <https://doi.org/10.1134/S0003683816070048>
- Kuchuk, N.V., Cell genetic engineering: Transmission genetics of plants, *Cytol. Genet.*, 2017, vol. 51, no. 2, pp. 103–107. <https://doi.org/10.3103/S0095452717020062>
- Kuchuk, N.V., Transgenic, transplastomic, and transient approaches to alien gene expression in plants, *Cytol. Genet.*, 2007, vol. 41, no. 3, pp. 172–175. <https://doi.org/10.3103/S0095452707030061>
- Kulshreshtha, A., and Mandadi, K.K., Plant viral vectors: important tools for biologics production, In *Appl. Plant Mol. Farm.*, 2024, pp. 1–24. Singapore: Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-97-0176-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-97-0176-6_1)
- Kwon, K.C., and Daniell, H., Oral delivery of protein drugs bioencapsulated in plant cells, *Mol. Therapy*, 2016, vol. 24, no. 8, pp. 1342–1350. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.115>
- Lai, J.Y., Ho, J.X., Kow, A.S.F., et al., Interferon therapy and its association with depressive disorders – A review, *Front. Immunol.*, 2023, vol. 14, pp. 1048592. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1048592>
- Leelavathi, S., and Reddy, V.S., Chloroplast expression of His-tagged GUS-fusions: a general strategy to overproduce and purify foreign proteins using transplastomic plants as bioreactors, *Mol. Breed.*, 2003, vol. 11, pp. 49–58. <https://doi.org/10.1023/A:1022114427971>
- Li, J., Chen, M., Liu, X.W., et al., Transient expression of an active human interferon-beta in lettuce, *Sci. Horticul.*, 2007, vol. 112, no. 3, pp. 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.12.047>
- Li, F., Li, Q.H., Wang, J.Y., et al., Effects of interferon-gamma liposomes targeted to platelet-derived growth factor receptor-beta on hepatic fibrosis in rats, *J. Control Release*, 2012, vol. 159, no. 2, pp. 261–270. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.12.023>
- Liu, C.J., Chuang, W.L., Lee, C.M., et al., Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for the treatment of dual chronic infection with hepatitis B and C viruses, *Gastroenterology*, 2009, vol. 136, no. 2, pp. 496–504. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.049>
- Lowther, W., Lorick, K., Lawrence, S.D., et al., Ex-pression of biologically active human interferon alpha 2 in *Aloe vera*, *Transgen. Res.*, 2012, vol. 21, pp. 1349–1357. <https://doi.org/10.1007/s11248-012-9616-0>
- Lu, Yi, Qi, J., Zhu, Q., et al., Adapting liposomes for oral drug delivery, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.06.005>
- Luchakivskaya, Y., Kishchenko, O., Gerasymenko, I., et al., High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants, *Plant Cell Reports*, 2011, vol. 30, pp. 407–415. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0942-5>
- Ma, J.K., Drake, P.M., and Christou, P., The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat. Rev. Genet.*, 2003, vol. 4, no. 10, pp. 794–805. <https://doi.org/10.1038/nrg1177>
- Maistrenko, O.M., Luchakivska, Y.S., Zholobak, N.M., et al., Obtaining of the transgenic *Heliantus tuberosus* L. plants, callus and «hairy» root cultures able to express the recombinant human interferon alpha-2b gene, *Cytol. Genet.*, 2015, vol. 49, pp. 308–313. <https://doi.org/10.3103/S0095452715050060>

- Martabano, B.B., Dow, S., Chow, L., et al., Intralesional interferon alpha-2b as a novel treatment for periocular squamous cell carcinoma in horses, *Plos One*, 2024, vol. 19, no. 2, pp. e0297366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0297366>
- Masumura, T., Morita, S., Miki, Y., et al., Production of biologically active human interferon- $\alpha$  in transgenic rice, *Plant Biotechnol.*, 2006, vol. 23, no. 1, pp. 91–97. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.23.91>
- Matvieieva, N.A., Kudryavets, Y.I., Likhova, A.A. et al. Antiviral activity of extracts of transgenic chicory and lettuce plants with the human interferon  $\alpha$ 2b gene. *Cytol. Genet.* 2012, vol. 46, no. 5, pp. 285–290. <https://doi.org/10.3103/S0095452712050076>
- Matvieieva, N.A., Ratushnyak, Y.I., Duplij, V.P., et al., Effect of Temperature Stress on the *Althaea officinalis*'s «Hairy» Roots Carrying the Human Interferon  $\alpha$ 2b Gene, *Cytol. Genet.*, 2021, vol. 55, no. 3, pp. 207–212. <https://doi.org/10.3103/S0095452721030051>
- Merigan, T.C., Purified interferons: Physical properties and species specificity, *Science*, 1964, vol. 145, pp. 811–813. <https://doi.org/10.1126/science.145.3634.811.b>
- Merlin, M., Pezzotti, M., and Avesani, L., Edible plants for oral delivery of biopharmaceuticals, *British J. Clin. Pharmacol.*, 2017, vol. 83, no. 1, pp. 71–81. <https://doi.org/10.1111/bcp.12949>
- Meyts, I., and Casanova, J.L. Viral infections in humans and mice with genetic deficiencies of the type I IFN response pathway, *Europ. J. Immunol.*, 2021, vol. 51, no. 5, pp. 1039–1061. <https://doi.org/10.1002/eji.202048793>
- Morisco, F., Vitaglione, P., Carbone, A., et al., Tomato-based functional food as interferon adjuvant in HCV eradication therapy, *J. Clin. Gastroenterol.*, 2004, vol. 38, pp. S118–S120. <https://doi.org/10.1097/01.mcg.0000128935.48082.f9>
- Nidoieva, Z.M., Peterson, A.A., Ruban, T.P., et al., The influence of recombinant interferon  $\alpha$ 2b synthesized in plants on the reparative enzyme MGMT expression in human somatic cells in vitro, *Cytol. Genet.*, 2019, vol. 53, no. 6, pp. 467–472. <https://doi.org/10.3103/S0095452719060070>
- Ohya, K., Matsumura, T., Ohashi, K., et al., Expression of two subtypes of human IFN- $\alpha$  in transgenic potato plants, *J. Interferon Cytokin. Res.*, 2001, vol. 21, no. 8, pp. 595–602. <https://doi.org/10.1089/10799900152547858>
- Ohya, K., Matsumura, T., Itchoda, N., et al., Ability of orally administered IFN- $\alpha$ -containing transgenic potato extracts to inhibit *Listeria monocytogenes* infection, *J. Interferon Cytokin. Res.*, 2005, vol. 25, no. 8, pp. 459–466. <https://doi.org/10.1089/jir.2005.25.459>
- Oppenheim, J.J., and Feldmann, M., Introduction to the role of cytokines in innate host defense and adaptive immunity, *Cytokine Reference*, 2001, vol. 1, pp. 3–20. (Cited from Cummins, J.M., Krakowka, G.S., Thompson, C.G. Systemic effects of interferons after oral administration in animals and humans. *Am. J. Vet. Res.*, 2005, vol. 66, no. 1, pp. 164–176. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.164>).
- Oppenheim, J.J., and Saklatvala, J., Cytokines and their receptors. In: Oppenheim JJ, Rossio JL, Gearing AJH, eds. Clinical applications of cytokines. Role in pathogenesis, diagnosis and therapy. New York: Oxford University Press, 1993, pp. 3–15. (Cited from Cummins, J.M., Krakowka, G.S., Thompson, C.G. Systemic effects of interferons after oral administration in animals and humans. *Am. J. Vet. Res.*, 2005, vol. 66, no. 1, pp. 164–176. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.164>).
- Ovcharenko, O., Rudas, V., Zholobak, N., et al., Production of biologically active human interferon  $\alpha$ -2b in transgenic «long-shelf life» tomato and its influence on immunological characteristics in mice, *10th International Meeting on Recent Advances in Plant Biotechnology*, 2024, pp. 15. [https://www.rapb-2024.com.ua/\\_files/ugd/e8b635\\_d6724ad15dce4760a9766ce95eb0aa69.pdf](https://www.rapb-2024.com.ua/_files/ugd/e8b635_d6724ad15dce4760a9766ce95eb0aa69.pdf)
- Ozgun, O.R.H.A.N., Karti, S., Sonmez, M.E.H.M.E.T., et al., Effects of interferon- $\alpha$ 2a on human hepatoma HepG2 cells, *Experim. Oncol.*, 2003, vol. 25, pp. 105–107. [https://d1wqtxtslxzle7.cloudfront.net/104480520/277-libre.pdf?1690190882=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DEFFECTS\\_OF\\_INTERFERON\\_ALFA\\_2a\\_ON\\_HUMAN\\_H.pdf&Expires=1726844206&Signature=PSyH4SUREmcJaVvA-SQMXEbmPWJcuMnT2VYQ3G~Xmh96dEcpSc2bARmZZMIP4rtzNJGDM1eDMXyFjoyfgCnfcps9-9L0tfHLJvHiNwREG5wkbLNrkx34U7LtaiS-T0995LucSzCVGD1ullwBgrB95IFyIZ09SkbfUOIWoL-XOLsVnlSNr3vU7aqCk8kc2oubEYhQGhO38BTdbhteC2N6LI5BQwXZ0ogI1m31VUGo2T-cmENe8xf4aUIOvldlcB2Wv9YImfQ7ROB~VwfiRrZxWrpLWY4kTAGVxfzBwLKh~WKlMaPUwVSO C3fp~E5DGFH8frp9zZ0oGwMUZHQkl~nwvA\\_\\_&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA](https://d1wqtxtslxzle7.cloudfront.net/104480520/277-libre.pdf?1690190882=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DEFFECTS_OF_INTERFERON_ALFA_2a_ON_HUMAN_H.pdf&Expires=1726844206&Signature=PSyH4SUREmcJaVvA-SQMXEbmPWJcuMnT2VYQ3G~Xmh96dEcpSc2bARmZZMIP4rtzNJGDM1eDMXyFjoyfgCnfcps9-9L0tfHLJvHiNwREG5wkbLNrkx34U7LtaiS-T0995LucSzCVGD1ullwBgrB95IFyIZ09SkbfUOIWoL-XOLsVnlSNr3vU7aqCk8kc2oubEYhQGhO38BTdbhteC2N6LI5BQwXZ0ogI1m31VUGo2T-cmENe8xf4aUIOvldlcB2Wv9YImfQ7ROB~VwfiRrZxWrpLWY4kTAGVxfzBwLKh~WKlMaPUwVSO C3fp~E5DGFH8frp9zZ0oGwMUZHQkl~nwvA__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA)
- Papasavvas, E., Azzoni, L., Pagliuzza, A., et al., Safety, immune, and antiviral effects of pegylated interferon alpha 2b administration in antiretroviral therapy-suppressed individuals: results of pilot clinical trial, *AIDS Res. Human Retrovir.*, 2021, vol. 37, no. 6, pp. 433–443. <https://doi.org/10.1089/aid.2020.0243>
- Pereda, R., González, D., Rivero, H.B., et al., Therapeutic effectiveness of interferon- $\alpha$ 2b against CO-

- VID-19: the cuban experience. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2020, vol. 40, no. 9, pp. 438–442. <https://doi.org/10.1089/jir.2020.0124>
- Potrokhov A., Trokhymenko A., Zubr Z., et al. Assessment of antiviral activity extract from trans-genic tobacco plants with human interferon  $\alpha$ -2b gene. Scientific issues of Ternopil Volodymyr Hna-tiuk National Pedagogical University. Series: Biology. 2017, vol. 3, pp. 64–69
- Potrokhov, A., Klymchuk, D., Akimov, Y., et al., Ultrastructural characteristics of mezophyll cells of transgenic tobacco plants with human interferon alpha 2b gene infected by tobacco mosaic virus, *Genet. Plant Physiol.*, 2014, vol. 4, pp. 174–181. [https://www.researchgate.net/publication/328314211\\_Special\\_Issue\\_Part\\_2-Conference](https://www.researchgate.net/publication/328314211_Special_Issue_Part_2-Conference)
- Razmi, S., Javaran, M. J., Bagheri, A., et al. Expression of human interferon gamma in tobacco chloroplasts, *Roman. Biotechnolog. Letters*, 2019, vol. 24, no. 2, pp. 208–215. <https://doi.org/10.25083/rbl/24.2/208.215>
- Rudas V., Zholobak N., Klebanovych A., et al., Analysis of the human *IFN $\alpha$ -2b* expression in transplastomic tobacco, *10th International Meeting on Recent Advances in Plant Biotechnology*, 2024, pp. 35. [https://www.rapb-2024.com.ua/\\_files/ugd/e8b635\\_d6724ad15dce4760a9766ce95eb0aa69.pdf](https://www.rapb-2024.com.ua/_files/ugd/e8b635_d6724ad15dce4760a9766ce95eb0aa69.pdf)
- Rudas, V.A., Piven, N.M., Rivkin, M.I., et al., The genetic transformation of *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* by using *Agrobacterium tumefaciens* carrying a plasmid with the human beta-interferon gene, *Tsitol. Genet.*, 1997, vol. 31, no. 2, pp. 17–22
- Ryff, J.C., To treat or not to treat?: The judicious use of interferon- $\alpha$ -2a for the treatment of chronic hepatitis B, *J. Hepatol.*, 1993, 17, pp. S42–S46. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(05\)80422-2](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(05)80422-2)
- Sack, M., Hofbauer, A., Fischer, R., et al., The increasing value of plant-made proteins. *Curr. Opinion Biotechnol.*, 2015, vol. 32, pp. 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.12.008>
- Sakhno, L.O., Kvasko, O.Y., Olevinska, Z.M., et al., Creation of transgenic *Brassica napus* L. plants expressing human alpha 2b interferon gene, *Cytol. Genet.*, 2012, vol. 46, pp. 342–346. <https://doi.org/10.3103/S0095452712060096>
- Seren, S., Mutchnick, M., Hutchinson, D., et al., Potential role of lycopene in the treatment of hepatitis C and prevention of hepatocellular carcinoma, *Nutrit. Cancer*, 2008, vol. 60, no. 6, pp. 729–735. <https://doi.org/10.1080/01635580802419772>
- Sindarovska, Y.R., Gerasymenko, I.M., Sheludko, Y.V., et al., Production of human interferon alpha 2b in plants of *Nicotiana excelsior* by *Agrobacterium*-mediated transient expression, *Cytol. Genet.*, 2010, vol. 44, no. 5, pp. 313–316. <https://doi.org/10.3103/S0095452710050099>
- Sindarovska, Y.R., Olevinskaya, Z.M., Demchenko, O.A., et al., *Nicotiana cavicola* as a host for production of recombinant proteins by *Agrobacterium*-mediated transient gene expression, *Biopolymers and Cell*, 2019, vol. 35, no. 5, pp. 340–348. <https://doi.org/10.7124/bc.000A11>
- Sindarovska, Y., and Kuchuk, M., Construction of viral-based expression vectors for high-level production of human interferon alpha 2b in plants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2024, vol. 108, no. 1, pp. 229. <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13069-7>
- Sirko, A., Vaněk, T., Gyra-Sochacka, A., et al., Recombinant cytokines from plants, *Inter. J. Mol. Sci.*, 2011, vol. 12, no. 6, pp. 3536–3552. <https://doi.org/10.3390/ijms12063536>
- Song, L., Zhao, D.G., Wu, Y.J., et al., Transient expression of chicken alpha interferon gene in lettuce, *J. Zhejiang University Sci. B*, 2008, vol. 9, no. 5, pp. 351–355. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0710596>
- Stomp, A.-M., Dickey, L., and Gasdaska, J., Expression of biologically active polypeptides in duckweed. Patent US 2012/0258491 A1, 2012 <https://patentimages.storage.googleapis.com/98/ea/8a/5d43a26d2d0302/US20120258491A1.pdf>
- Stroud, R.M., Laporte, S., and Wells, J.A., Cytokine-receptor signaling at the molecular level, *Cytokine References. New York: Academic Press Inc.*, 2001, pp. 21–34. (Cited from Cummins, J. M., Krakowka, G. S., Thompson, C. G. Systemic effects of interferons after oral administration in animals and humans, *Am J Vet Res*, 2005, vol. 66, no. 1, pp.164–176. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.164>)
- Thompson, L.A., Grieshaber, T.L., Glickman, L., et al., Human recombinant interferonalpha-2b for management of idiopathic recurrent superficial pyoderma in dogs: a pilot study, *Veterinary Therapeutics: Res. Appl. Veterin. Med.*, 2004, vol. 5, no. 1, pp. 75–81
- Verhaar-Langereis, M.J., Bongers, V., de Klerk, J.M., et al., Interferon-alpha induced changes in CEA expression in patients with CEA-producing tumours, *Europ. J. Nucl. Med.*, 2000, vol. 27, pp. 209–213. <https://doi.org/10.1007/s002590050029>
- Vlatkovic, R., Jkic, D., and Jusic, D., Application of human leukocyte interferon in severe cases of virus B hepatitis, *Proc. Symposium on Interferon*, 1979, pp. 173–183
- Watanuki, H., Chakraborty, G., Korenaga, H., et al. Immunostimulatory effects of natural human interferon-alpha (huIFN- $\alpha$ ) on carps *Cyprinus carpio* L., *Veterinary Immunol. Immunopathol.*, 2009, vol. 131, no.3–4, pp.273–277. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.02.005>

- Wei, P., Lv, Y., Guang, Q., et al., ChIFN $\alpha$  regulates adventitious root development in *Lotus japonicus* via an auxin-mediated pathway, *Plant Signal. Behav.*, 2023, vol. 18, no. 1, pp. 2218670. <https://doi.org/10.1080/15592324.2023.2218670>
- Xu, Z., Gong, L., Peng, P., et al., Porcine enteric alpha-coronavirus inhibits IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , OAS, Mx1, and PKR mRNA expression in infected peyer's patches in vivo, *Front. Vet. Sci.*, 2020, vol. 7, pp. 449. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00449>
- Yaroshko O., Rudas V., Ovcharenko O., et al., High level human interferon alpha-2b production in transgenic tomatoes, *Celtic cytokines sensing and interpreting cytokine and interferon cues, 9-th Annual meeting of the International Cytokine and Interferon Society*, 2021, Cardif (Wales UK), pp. 53–54
- Yaroshko, O., Ovcharenko, O., Zholobak, N., et al., Expression of *HuINFalpha-2b* gene in transgenic tomato plants of the cv. Shedevr long shelf-life variety and maintenance of physiologically active human interferon alpha-2b during fruit storage, In *FEBS OPEN BIO*, 2022, vol. 12, pp. 278–278. 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY
- Ye, J., and Chen, J., Interferon and hepatitis B: current and future perspectives, *Frontiers in Immunology*, 2021, vol. 12, pp. 733364. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.733364>
- Zarochentseva, N.V., Belaiya, J.M., and Malinovskaya, V.V. Combined use of interferon alpha-2b drugs with tetravalent vaccine against reinfection in HPV female patients, *Electron J. Gen. Med.*, 2020, vol. 17, no. 6, pp. em257. <https://doi.org/10.29333/ejgm/8369>
- Zhao, L., Wang, L., Di, S. N., et al. Steroidal alkaloid solanine A from *Solanum nigrum* Linn. exhibits anti-inflammatory activity in lipopolysaccharide/interferon  $\gamma$ -activated murine macrophages and animal models of inflammation, *Biomed. Pharmacotherapy*, 2018, vol. 105, pp. 606–615. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.019>

Надійшла в редакцію 05.07.2025  
Після доопрацювання 05.08.2025  
Прийнята до друку 18.11.2025