

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ФАКУЛЬТЕТ БІОЛОГІЇ, ГЕОГРАФІЇ ТА ЕКОЛОГІЇ  
КАФЕДРА БІОЛОГІЇ ЛЮДИНИ ТА ІМУНОЛОГІЇ**

**Показники антиоксидантного статусу в умовах дії інтерферону**

Кваліфікаційна робота (проект)  
на здобуття ступеня вищої освіти “магістр”

Виконав: студент 05-211 групи  
Спеціальності 091 Біологія  
Освітньо-професійної програми  
Біологія  
Рябченко Андрій Ігоревич

Керівник: доктор біологічних наук,  
професор Зав'ялов В.П.

Рецензент: кандидат географічних  
наук, доцент Давидов О.В.

Херсон – 2020

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	3
<b>РОЗДІЛ 1. Огляд літературних джерел</b> .....	5
1.1. Поняття про вільнорадикальні процеси .....	5
1.2. Процеси перекисного окиснення ліпідів .....	11
1.3. Антиоксидантний захист організму .....	14
1.3.1. Кисень-залежний апоптоз.....	23
1.4. Інтерферонова система.....	23
<b>РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи дослідження</b> .....	36
2.1. Організація дослідження.....	36
2.2. Метод оцінки продуктів ТБК у еритроцитах.....	37
2.3. Визначення активності супероксиддисмутази.....	38
2.4. Визначення активності каталази.....	39
<b>РОЗДІЛ 3. Аналіз та обговорення отриманих результатів</b> .....	40
3.1. Показники вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів.....	40
3.2. Показники активності супероксиддисмутази у досліджуваних групах.....	41
3.3. Рівень активності каталази еритроцитів під впливом інтерферону.....	42
<b>ВИСНОВКИ</b> .....	44
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b> .....	46

## ВСТУП

*Актуальність теми.* Система антиоксидантів-прооксидантів відіграє важливу роль у забезпеченні гомеостазу організму. Еволюційний процес забезпечив клітини живих організмів спеціалізованою системою антиоксидантних ферментів, до яких належать такі ензими як супероксиддисмутаза, глутатіон-залежні пероксидази, трансферази, каталаза, глутатіон-редуктаза, гемоксигеназа, трансфери, церулоплазмін та багато інших [24]. При цьому, активність цих ферментних систем залежить і від активності відповідних генів [19]. Вважається, що вплив гіпоксії, гіпероксії та інших несприятливих факторів здатні індукувати оксидативний стрес [40].

Інтерферони являють собою родину протеїнів і глікопротеїнів (з незначною молекулярною масою), що продукуються клітинами системи у відповідь на уведення різного виду індукторів (синтетичних та природних) [4]. Разом з тим, інтерферони належать до групи, яку називають «цитокін», що відіграє важливу роль у імунній системі, відповідають за регуляцію імунної відповіді [34].

Відомо, що інтерферони спричиняють пригнічення метаболізму в клітині, впливають на активність мітохондріальних ферментів, здатні змінювати проникність мембрани клітин, зупиняють білок-синтетичні процеси [34].

Зважаючи на вищевикладене, вивчення впливу рекомбінатного інтерферону на антиоксидантно-прооксидантний стан організму є актуальним та сучасним.

*Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами:* робота виконана в межах науково-дослідної теми «Дослідження механізмів плейотропного впливу рекомбінантного інтерферону альфа на організм» (державний реєстраційний номер 0117U005021).

*Мета дослідження.* Дослідити антиоксидантний статус під впливом рекомбінантного інтерферону альфа.

*Об'єкт дослідження.* Вплив інтерферону на антиоксидантний статус.

*Предмет дослідження.* Показники антиоксидантного статусу еритроцитів мишей під впливом рекомбінантного інтерферону альфа.

Згідно мети, об'єкту та предмету дослідження ми визначили завдання дослідження:

1. З'ясувати роль активних форм кисню та продуктів окиснення ліпідів у клітинних процесах;
2. Розглянути роль інтерферонів у противірусному захисті;
3. Дослідити вміст малонового діальдегіду у еритроцитах тварин під впливом високої дози інтерферону альфа;
4. Визначити активність ферменту супероксиддисмутази у еритроцитах після впливу на організм інтерферону;
5. Дослідити каталазну активність еритроцитів за умов уведення високих доз інтерферону.

*Методи дослідження.* Використовувалися наступні прийоми та методи: проведено огляд наукової літератури з тематики дослідження; здійснено експериментальне дослідження показників перекисного окиснення ліпідів, супероксиддисмутази та каталази.

*Наукова новизна.* Отримано нові відомості щодо плейотропних ефектів інтерферону на організм ссавців. Це стосується ферментативних властивостей та антиоксидантного статусу у тварин, відомості про які в умовах дії рекомбінантного інтерферону є неповними та суперечливими.

*Практична новизна.* Отримані експериментальні відомості доцільно застосувати у освітньому процесі Херсонського державного університету під час викладання курсів «Фізіологія людини і тварин», «Імунологія». Також отримані навички під час виконанні експериментальної частини випускної роботи можуть стати у професійній діяльності здобувача на посаді біолога у лабораторіях.

*Апробація результатів дослідження.* Результати досліджень обговорювалися під час виступів на наукових семінарах кафедри біології людини та імунології Херсонського державного університету у 2019-2020 роках.

*Структура роботи.* Робота складається із вступу, огляду літературних джерел, опису матеріалів і методів дослідження, аналізу та обговорення отриманих результатів, висновків та списку використаних джерел із 40 найменувань. В роботі міститься 9 рисунків.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

### 1.1. Поняття про вільнорадикальні процеси

На сьогоднішній день накопичено величезну кількість експериментального та теоретичного матеріалу на основі якого можна стверджувати, що вільні радикали є важливішими учасниками більшості реакцій, які відбуваються у живих клітинах [6].

Вільний радикал – молекула або її частина, яка істить неспарений електрон на молекулярній або зовнішній атомній орбіті. Наявність такого електрона наділяє систему високою реакційною здатністю у хімічних перетвореннях. У клітині ініціація вільнорадикальних процесів здійснюється активними формами кисню [32].

Активні форми кисню (або активні кисневі метаболіти) – це високореактивні, у переважній більшості кисень-вмісні сполуки, які утворюються у живих організмах в результаті неповного відновлення молекулярного кисню або зміни спіну одного з його електронів, який перебуває на його зовнішніх орбіталях [15].

Останнім часом було виявлено широкий спектр фізіологічних ефектів активних форм кисню до яких, перш за все, належать регуляція клітинної проліферації та тону судин, індукція транскрипції певних генів. Показано, що функціонування активних форм кисню у клітині відбувається в якості вторинних внутрішньоклітинних посередників. Наприклад, чупероксидний аніон-радикал та перекис водню активує фактор транскрипції NF- $\kappa$ B, який викликає експресію генів, що кодують ряд цитокінів та вірусів. Нітросильний радикал зв'язується з гемовою частиною гуанілатциклази та зворотно змінює синтез цГМФ [15].

На сьогодні відомо декілька систем, які продукують активні форми кисню за нормальних, фізіологічних умов [25]:

1. Оксидазні реакції;
2. Оксигеназні реакції;
3. Комплексування кисню йонами металів змінної валентності;
4. Аутоокислення гемоглобіну;
5. Реакція гіпоксантин-ксантинооксидаза;
6. Пероксисоми;
7. Система фагоцитозу.

*Оксидазні реакції* протікають на внутрішній мембрані мітохондрій. Продуктами реакцій даного типу є окиснений субстрат та вода. Кисень у цих процесах розходується у кінцевому етапі на утворення енергії. За умов чотирьохелектронного відновлення кисню до води у мітохондріях відбувається поступове приєднання по одному електрону з утворенням активних форм кисню. Перший електрон приєднується до молекули кисню на першому етапі під час переносу Електронів з НАДН<sub>2</sub> на коензим Q. У результаті цього утворюється перший вільний радикал – супероксид аніон-радикал. Приєднання наступного електрону спричиняє утворення пероксиду, третього – гідроксильного радикалу і нарешті – четвертого з утворенням молекул води.

*Оксигеназні реакції* супроводжуються приєднанням або одного атому кисню (так звані монооксигеназні реакції), або усієї молекули кисню (діоксигеназні реакції) до молекули окиснюваного субстрату.

У цих реакціях подолання хімічної інертності кисню досягається за участі ферментів, активні центри яких містять або йони металів із змінною валентністю або дигідрофлавіни, які здатні утворювати радикали семіхінового типу та супероксид аніонний радикал. НАДФН цитохром P450-залежна система гідроксилювання ксенобіотиків міститься головним чином к ендоплазматичному ретикулюмі печінки. Прикладом діоксигеназних реакцій, зокрема, є перетворення арахідонової кислоти у важливі біологічно активні сполуки лейкотрієни, простагландини та

тромбоксани разом із залученням циклооксигеназ та ліпооксигеназ сироватки крові.

*Комплексування кисню йонами металів* із змінною валентністю. У живому організмі міститься достатня кількість металів, що мають змінну валентність (наприклад залізо, мідь, магній, марганець), які сприяють подоланню інертності молекулярного кисню, утворюючи у реакціях з ним активні форми. Прооксидантні властивості йонів заліза та міді описані багатьма дослідниками. Відомо, що наявність йонів цих металів є однією з необхідних властивостей перебігу процесів ланцюгового окиснення ліпідів. В якості прооксиданту залізо здатне ініціювати утворення продуктів перекисного окиснення ліпідів, приймаючи участь у реакції Фентона.

*Аутоокиснення гемоглобіну* у метгемоглобін призводить до утворення супероксидного радикалу.

*Пероксисоми* є одним із головних джерел генерації перекису водню у клітині. На частину цих органел припадає приблизно до 35% перекису водню, який утворюється у клітині. Пероксисоми складають особливу групу цитоплазматичних часточок, які обмежені одинарною мембраною та тих, які містять пероксид-генеруючих ферментів: оксидаза L-амінокислот, D-амінокислот, уратоксидазу, гліцилоксидазу, ацил-КоА-оксидазу жирних кислот та ін.

*Система фагоцитозу* – сукупність клітин та гуморальних факторів, які забезпечують основний рівень структурного гомеостазу. Ця функція реалізується за рахунок реакцій, які володіють деструктивною, трофічною та регуляторною спрямованістю. Центром системи фагоцитозу слугують фагоцити.

Фагоцити умовно діляться на дві групи – мікрофаги та макрофаги, або поліморно-ядерні (полінуклеарні) та мононуклеарні. До групи мікрофагів належать нейтрофіли, еозинофіли та базофіли крові. До макрофагів також відносяться клітини, що перебувають у складі тканин



та їхні попередники – монобласти та моноцити. До числа тканинних макрофагів належать альвеолярні, плевральні, перитонеальні макрофаги, макрофаги селезінки, лімфовузлів, Купферівські клітини печінки, А-синовіальні клітини суглобів, клітини мікроглії. Мікрофаги та макрофаги володіють здатністю розпізнавати, поглинати та знищувати чужорідні субстрати [2].

Ефекти фагоцитозу визначаються кисень-залежними процесами, які мають назву окисного або респіраторного вибуху. Важлива та своєрідна форма реактивності фагоцитів – активація кисню з перетворенням його у потужний інструмент біоагресивності. Утилізуючи кисень, фагоцити виконують чисто ефекторні задачі, напрацьовуючи комплекс молекул, які атакують певні об'єкти фагоцитозу.

Схема подій, які призводять до респіраторного вибуху, складається з певних етапів. Стимуляція клітин призводить до активації НАДФН-оксидази, яка каталізує перенесення електрону з НАДФН<sub>2</sub> – оксидаз на молекулярну форму кисню, що спричиняє зниження вмісту НАДФН<sub>2</sub> та стимулює посилення метаболізму глюкози у гексозофосфатному шунті [2].

Супероксидний аніон, який утворюється у результаті цієї реакції, дає початок іншим прооксидантам з високим енергетичним потенціалом. Дві молекули супероксиду можуть вступати у реакцію дисмутації. У присутності води утворюється перекис водню. Така реакція може відбуватися випадково, проте значно інтенсивніше протікає за присутності ферменту супероксиддисмутази. Перекис водню володіє мікробіцидною активністю і в присутності йонів галогену та мієлопероксидази можуть генерувати галогенові радикали, такі як гіпохлорид- та гіпохлоридна кислота. Утворені гіпохлориди високотоксичні для клітин, мембран грибів, бактерій та вірусів (через те, що відбувається галогенування складників клітинних оболонок, окисне

декарбоксілювання). Перекис водню також здатен приймати наступний електрон, як результат утворюється гідроксильний радикал [3].

Надлишок енергії реалізується шляхом виділення тепла, підвищеної хімічної активності (завдяки чому реалізується така висока біоцидність), або емісії квантів світла (або т.зв. хемілюмінесценція) [13].

Таким чином, функціональна активність фагоцитуючих клітин крові та тканин у значній мірі обумовлена їхньою здатністю генерувати активні форми кисню. Саркоплазматичний ретикулум разом із мієлопероксидазою та галогенами формують апарат кисень-залежної біоцидності – найважливіший ефекторний ланцюг фагоцитарних реакцій та один з найчутливіших індикаторів збудження клітин.

Таким чином, утворення активних форм кисню, відомих під назвою прооксиданти, в організмі необхідно розглядати як суттєвий та обов'язковий елемент процесу життєдіяльності. Окисні процеси за участі активних форм кисню є невідомою складовою існування вищих форм живих організмів, неентропійний стан яких підтримується завдяки зниженню електронної упорядкованості молекулярного кисню у результаті його відновлення [9].

Висока активність вільних радикалів у певній мірі компенсована їхнім коротким періодом життя та невеликим радіусом дії. Проте, при їхній взаємодії з нерадикальними сполуками можуть сформуватися нові вільні радикали, які знову вступають у реакцію. Таким чином, цей процес має каскадний характер, здійснюючи вплив на значній відстані від місця утворення первинних радикалів.

Усі компоненти клітини – білки, ліпіди, нуклеїнові кислоти та вуглеводні можуть бути пошкоджені вільними радикалами, призводячи до вагомих порушень структури та функції клітини.

На сьогодні найбільш вивченою є вільно-радикальна деструкція ліпідів або так зване перекисне окиснення ліпідів. Активні форми кисню здатні атакувати ненасичені жирні кислоти фосфоліпідів та інших

мембранних ліпідів, тим самим ініціюючи ланцюг ліпідної пероксидації. Перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) спричиняє серйозне пошкодження мембранних структур, змінює їхню рідинність та здатність адекватно функціонувати. Продукти ПОЛ здатні інгібувати синтез білків, змінювати судинну проникність, запальну реакцію та хемотаксичну активність [17].

Вільнорадикальній модифікації можуть підлягати білки, окиснені форми яких розглядаються як один із ранніх маркерів окисного ураження клітин. Окисній модифікації можуть піддаватися майже усі амінокислотні залишки білків, що призводить до зміни структурної організації білкової молекули. Структурні зміни окиснених білків можуть супроводжуватися їхньою агрегацією або фрагментацією. При окислювальній деструкції білків підвищується їхня гідрофобність та чутливість до протеолізу (рис. 1.1).



**Рис. 1.1. Схема утворення продуктів перекисного окиснення ліпідів з арахідонової кислоти**

Вільні радикали спричиняють появу розривів молекул ДНК. Проте більша частина пошкоджень нуклеїнових кислот відбувається через окиснюючу деструкцію їхніх основ та дезоксирибози, які беруть участь в утворенні поперечних зшивань. Більш чутливими по відношенню з дезоксирибозою до дії вільних радикалів є азотисті основи ДНК. При подвійних розривах ДНК залишки дезоксирибози модифікуються швидше, ніж основищо обумовлено їхнім розташуванням на зовнішній стороні спіралі [23].

## **1.2. Процеси перекисного окиснення ліпідів**

За даними деяких дослідників, до 10 % утворених вільних радикалів за нормальних умов здатні полишати мембрану та починати вільно радикальні реакції на ліпідах мембран. У 1968 році було сформульовано положення про безперервний перебіг вільнорадикального окиснення ліпідів за нормальних умов як про важливий фактор гомеостазу. Ці автори стверджували, що вільно радикальне окиснення безперервно відбувається у нормі у всіх тканинах живих організмів та вільно радикальні процеси за умов їхньої низької інтенсивності є одним із типів нормальних метаболічних процесів [30].

Основним субстратом для перебігу перекисного окиснення ліпідів є полі ненасичені жирно кислотні залишки фосфоліпідів мембран та ліпопротеїдів плазми. Оскільки енергія розриву С- та Н- зв'язків є найбільш мінімальною у карбону, який перебуває у альфа-положенні по відношенню до подвійного зв'язку, то відрив водню відбувається саме там. Та, відповідно, чим більше подвійних зв'язків, тим ефективніше відбувається окиснення. Як відомо, основною поліненасиченою жирною кислотою є ейкозтетраєнова або арахідонова, яка являє собою основний субстрат перекисного окиснення ліпідів.

Продукти перекисного окиснення ліпідів поділяються на проміжні продукти радикальної природи та молекулярні продукти. До проміжних

продуктів належать активні форми кисню та алкільні, алкоксильні, пероксисильні радикали.

Молекулярні продукти перекисного окиснення ліпідів можна класифікувати наступним чином [40]:

1. Первинні (гідро перекиси, діє нові кон'югати, ендоперекиси), які утворюються на стадії подовження ланцюга. Одним із основних критеріїв інтенсивності процесів ПОЛ є утворення полінасичених жирних кислот, які спряжені подвійним зв'язком. У нативних жирних кислотах подвійні зв'язки не спряжені, проте розділяються декількома одинарними зв'язками. Спряжені системи утворюються в результаті міграції подвійних зв'язків після утворення перекисної групи.
2. Вторинні (або карбонільні продукти: алканами, алкенами, гідроксиалкенами, малоновийдеальдегід, трієнові конюгати. Трієнові конюгати утворюються завдяки полінасиченим жирним кислотам при спряженні трьох подвійних зв'язків з максимумом поглинання 275 нм. Ці продукти на наступній стадії окиснення розпадаються до альдегідів та кетонів. Одним із продуктів є малоновий діальдегід, його реакція з тіобарбітуровою кислотою широко застосовується для оцінки інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів.
3. Кінцеві продукти. Ці продукти, особливо малоновий діальдегід, взаємодіє з аміногрупами фосфоліпідів та білків, утворюють полімерні флуоресцюючі сполуки, які називають основами Шиффа. Основи Шиффа є методом флуоресценції при довжині хвилі 365 нм та довжині хвилі емісії 420 нм. До кінцевих сполук належать також газоподібні сполуки – гептан, пентан, етан, пропан які виявляють за допомогою методу газової хроматографії.

На сьогодні, накопичено твєличезну кількість матеріалу про біологічну роль продуктів перекисного окиснення ліпідів. Зокрема, перекиси ліпідів використовуються організмом для синтезу простагландінів, лейкотрієнів та стероїдних гормонів, визначають здатність клітини до міграції, фагоцитозу, диференціації та злипання, регулюють проникність клітинних мембран, беруть участь у регуляції адреналової системи, сперматогенезі, є ефекторами деяких ферментативних реакцій. Продукти перекисного окиснення ліпідів у низьких концентраціях відіграють регуляторну роль у забезпеченні процесів відновлення у нервовій тканині після збудження. Для деяких мембрано вбудованих ферментів перекиси ліпідів виступають у ролі активаторів. Наприклад, у невеликій кількості перекис лінолевої кислоти збільшує активність сукцинатдегідрогенази [32].

Виділяють чотири основних аспекти метаболічного впливу ендогенних перекисів [32]:

1. За високих концентрацій ендогенних перекисів ліпідів (або ліпоперекисів) значна кількість енергетичного субстрату втрачається, оскільки переводиться з русла ферментативного окиснення у русло патогенетичного вільнорадикального окиснення.

2. Активація вільнорадикальних процесів призводить до якісної зміни складу ліпідних фракцій мембран, що викликає зміни їхніх фізичних властивостей. У першу чергу окислюються ненасичені «рідинні» ліпіди та залишаються більш насичені, тобто більш «тверді». Зміни фізичних властивостей, підвищення в'язкості ліпідної фази рівноцінно зниженню температури та призводить до зниження швидкості усіх ферментних процесів. При короткочасних періодах підвищення активності вільно радикальних процесів ці процеси під впливом антиокиснювачів зворотні та виконують регуляторну роль. Тривала активація цього процесу спричиняє зменшення еластичності та механічної щільності мембран..

3. Зміна якісного складу ліпідів мембран здійснює індивідуальний вплив на активність ліпід-залежних мембрано вбудованих ферментів. Оскільки кожний фосфоліпід слугує специфічним ефектором для одного й того ж ферменту, зміна їх співвідношень призводить до зміни швидкостей різноманітних ферментативних реакцій.

4. Активація вільно радикальних процесів та накопичення гідро перекисів змінюють проникність мембран. Неокиснені жирні кислоти у нормі гідрофобні. Гіперокиснені жирні кислоти стають полярними та гідрофільними, при їхньому утворенні порушується гідрофобність ліпідного бішару та у ньому утворюються гідрофільні пори. Відбувається порушення бар'єрних властивостей мембрани, вона стає проникною для гідролітичних ферментів або для йонів кальцію, що й спричиняє активацію метаболізму живої клітини. За тривалої активації аналогічний механізм призводить до руйнування мембран та дезорганізації метаболізму.

Таким чином, вільно радикальне окиснення є фізіологічним процесом, який забезпечує регуляцію клітинної активності. Проте, надлишкова поява прооксидантних компонентів призводить до повного руйнування ненасичених ліпідів, порушення структури та функції білків, нуклеїнових кислот та інших молекул та у кінцевому підсумку – до загибелі клітин. Для обмеження цих процесів існують захисні механізми.

### **1.3. Антиоксидантний захист організму**

Окисні процеси, які супроводжуються генерацією активних форм кисню? являють собою обов'язків атрибут нормального аеробного життя. Функціонування та розвиток клітин у кисень-вмісному оточенні не могло б бути можливим без існування захисних систем. Постійне утворення прооксидантів у живих організмах врівноважено тією-ж швидкістю їх дезактивації антиоксидантами. Саме тому для підтримки гомеостазу необхідна безперервна генерація антиоксидантної здатності [22].

Загалом, клітина володіє складною системою захисту від пошкоджуючого впливу активних форм кисню. Ця система складається з двох наступних механізмів: ті, які перешкоджають паразитарні хімічні реакції одноелектронного відновлення кисню та ті, що прибирають продукти такого відновлення.

Один зі способів попередження шкідливого впливу активних форм кисню є зменшення концентрації кисню та його одноелектродних відновлювачів. Це може бути досягнуто поглинанням кисню, який не спряжений із синтезом АТФ. Зокрема, появою неомічної протонної втрати у мембрані мітохондрій при підвищенні рівня градієнта електрохімічного потенціалу для атомів водню, утворенням пор у мітохондріальній мембрані, активації особливих дихальних механізмів, які не утворюють градієнт електрохімічного потенціалу [26].

У боротьбі із утвореними продуктами т.зв. паразитарних реакцій кисню беруть участь антиоксиданти. Антиоксидантна активність клітини забезпечується також структурною організацією. Суворо визначена орієнтація ліпідів у білок-ліпідних комплексах та значна щільність упакування насичених жирних кислот у фосфоліпідах мембран утруднює доступ до них кисню та його активних форм та виключає можливість їхнього самостійного окиснення у полінасичені жирні кислоти. Цей важливий неспецифічний фактор регуляції перекисного окиснення ліпідів діє на усіх етапах процесу.

Антиоксидантна система захисту організму містить ферментні та не ферментні антиоксиданти. Ферментні антиоксиданти характеризуються високою специфічністю дії, яка направлена проти певних форм активних форм кисню; клітинною та тканинною локалізацією, а також застосування в якості каталізаторів металів зі змінною валентністю (наприклад, купрум, цинк, манган, ферум, селен). До цієї групи антиоксидантів належать такі ферменти як супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза, глутатіонтрансфераза та



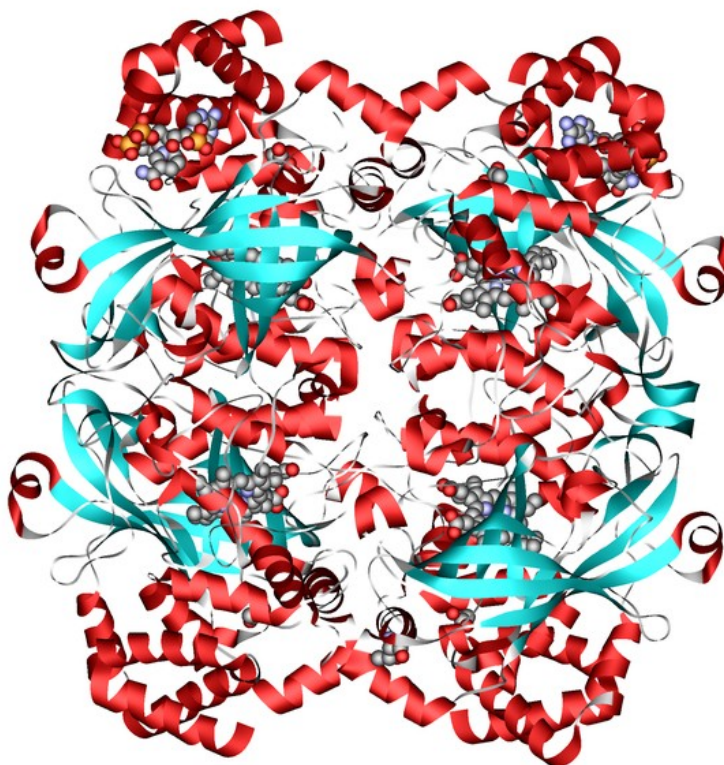
глутатіонредуктаза. Система антиоксидантних ферментів відповідає за видавлення активних форм кисню та супероскидних радикалів, беруть участь у розкладанні гідроперекисів безрадикальним шляхом [41].

Супероксиддисмутаза є ферментом, який має декілька ізоферментних форм, які відрізняються за будовою активного центру. Купрум, цинкова форма міститься у цитозолі та між мембранному просторі мітохондрій, манганова форма локалізована у мітохондріях. Наявність залізовмісного ферменту показано у прокаріот, а у еукаріот лишень у невеликих кількостях у мітохондріях. Супероксиддисмутаза являє собою переважно внутрішньоклітинний фермент, а у міжклітинній рідині (наприклад, сироватка крові, плазма, лімфа, синовіальна рідина) швидко, протягом 5-10 хвилин руйнується. Супероксиддисмутаза є єдиним антиоксидантним ферментом, який безпосередньо забезпечує обрив ланцюгів кисень-залежних вільно радикальних реакцій. Супероксиддисмутаза перетворює супероксидний радикал у перекис водню і таким чином, ця реакція виступає лімітуючим ланцюгом усього процесу перекисної оксидації ліпідів [16].

Широка участь супероксидних радикалів у ферментативних реакціях синтезу простагландинів та метаболізму ксенобіотиків, а також клітинної проліферації та експресії певних генів дозволяє розглядати супероксиддисмутазу як фермент, який виконує не тільки захисну, а й регуляторну функції.

Каталаза є гем-вмісним ферментом, який локалізований переважно у пероксисомах, де їхня концентрація досягає  $10^{-6}$  М. За структурою, каталаза є тетраметром, який містить по одній міцно зв'язаній гемовій простетичній групі на субоддиницю. Каталаза, яка є синергістам супероксиддисмутази, перешкоджає накопиченню перекису водню. Між активністю каталази та супероксиддисмутази виявлено високодостовірну кореляцію [31].

Фермент каталізує двохелектронне відновлення перекису водню до води і тим самим виключає утворення з перекису активних радикальних ініціаторів вільнорадикального кисню. Окрім цього, каталаза може виступати джерелом утворення активних форм кисню, так, біля 0.5 % кисню, який утворюється у результаті розкладання перекису водню, перебуває у збудженому синглетному стані. Каталаза належить до ферментів, які найбільш тривалий час зберігають свою високу активність, майже не потребують енергії активації (рис. 1.2).

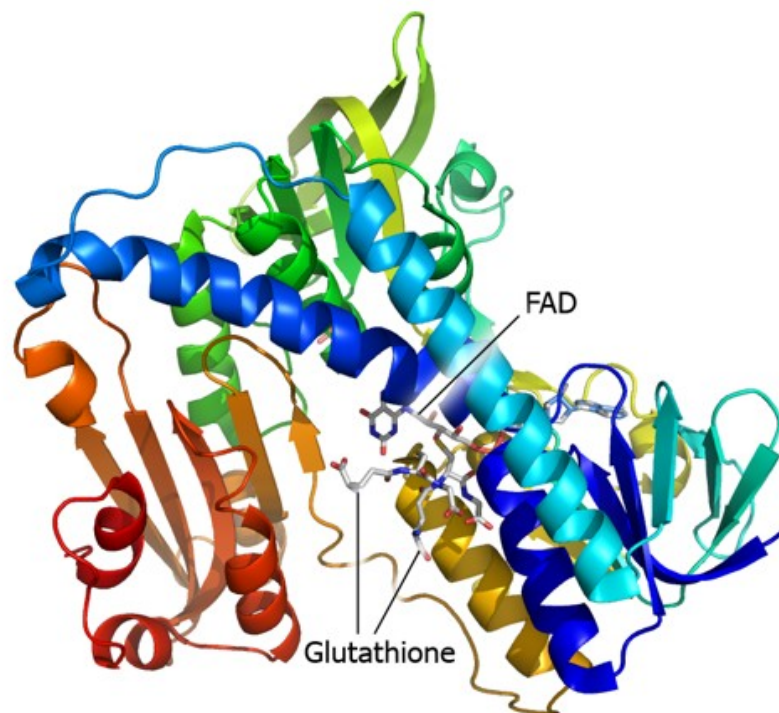


**Рис. 1.2. Структура молекули каталази**

У той же час завдяки високомолекулярній масі, каталаза погано проникає усередину клітин та у позаклітинних рідинах швидко втрачає свою активність у результаті дії протеолітичних ферментів [39].

Максимальна активність цього ферменту була виявлена у еритроцитах. Серед п'ятдесяти ферментів еритроцитів каталаза займає перше місце за кількістю та активністю.

Глутатіонпероксидаза аналогічно каталазі відновлює перекис водню до води та розкладає гідроперекиси ліпідів. Фермент має дві ізоферментні форми: селен-вмісну та селен-невмісну. Селен-вмісна форма приймає участь у відновленні перекису водню та полінасичених жирних кислот. Селен-вільна форма приймає участь виключно у відновленні органічних перекисів (гідроперекиси вільних жирних кислот, стероїдів та холестерину), внаслідок чого її називають ліпопероксидазою. Переважна більшість глутатіонпероксидази локалізується у цитозолі, а 25% - містяться в матриксі мітохондрій. Спорідненість глутатіонпероксидази до перекису водню є вищою, ніж у каталази. Саме тому, глутатіонпероксидаза найбільш ефективно працює за низьких концентрацій перекису водню. У той же час, у захисті клітин від окислювального стресу, викликаного високими концентраціями перекисів, ключова роль належить каталазі (рис. 1.3).



**Рис. 1.3. Просторова модель будови глутатіонпероксидази**

Глутатіонтрансфераза використовує відновлений глутатіон для кон'югації з гідрофобними сполуками та відновлення органічних

пероксидів. Глутатіонтрансфераза локалізована переважно у цитозолі клітин. Основна функція цього ферменту – захист клітин від ксенобіотиків та продуктів перекисного окиснення ліпідів за допомогою їхнього відновлення або приєднання до субстрату молекули глутатіону або нуклеофільного заміщення гідрофобних груп [8].

Глутатіонредуктаза каталізує відновлення окисненого глутатіону у НАДФ-залежній реакції.

Відновлений глутатіон являє собою донор електронів та активний центр обох глутатіонпероксидаз, а його присутність у клітині є обов'язковою умовою ре активації ферменту, внаслідок чого відсутність у клітині достатнього вмісту НАДФН може стати лімітуючим фактором відновлення перекису водню до гідроперекисів ліпідів [28].

Таким чином, ферментативні антиоксиданти являють собою засіб внутрішньоклітинного захисту – у сироватці крові, лімфі виявляються лишень їх слідові залишки. Разом з тим, активні форми кисню,Ю які мігрують з клітини у міжклітинний простір, дають можливість у всіх водних та ліпідних фазах організму розвиватися радикальним окисним процесам.

Антиокислювальний захист у таких умовах здійснюють не ферментативні антиоксиданти.

У залежності від механізму дії, ці компоненти антиокислювальної системи поділяються на :

1. Антирадикальні інгібітори (взаємодіють із органічними радикалами);
2. Хелатори (зв'язують йони металів змінної валентності);
3. Антиокиснювачі (взаємодіють з органічними перекисами);
4. Гасники (інактивують синглетний кисень).

Неферментні антиоксиданти представлені жиророзчинними та водорозчинними компонентами. До жиророзчинних належать вітаміни К, А, токофероли, убіхінони, стероїдні гормони та холестерин, до

водорозчинних – глутатіон, аскорбінова кислота, сечова кислота, серотонін та гістамін.

Одним з найбільш вивчених природних антиоксидантів є токоферолі (вітаміни групи E), які є сполуками, що синтезуються у рослинах та потрапляють до організму тварин з їжею. Наявність бічного ланцюга у природних токоферолів утруднює їхній між мембранний перенос. У результаті відбувається ущільнення ліпідного бішару та захист інтегральних білків від ушкоджуючого впливу активних форм кисню. Головною діючою складовою, яка забезпечує токоферолам здатність гальмувати радикальні процеси окиснення є гідроксильна група, яка приєднана до ароматичного ядра. Завдяки наявності у структурі ароматичного кільця пов'язаного системою пі-орбіталей, відбувається зміщення негативного заряду на молекулу кисню, результатом чого стає достатньо легкий відрив атому гідрогену від гідроксилу [28].

Найбільшу антиоксидантну активність проявляє альфа-токоферол. Так, одна молекула альфа-токоферолу захищає десять тисяч молекул полінасичених жирних кислот, пригнічує біля 60% усіх радикалів у мембрані.

Схожий за будовою та властивостями з альфа-токоферолом убіхінон (коензим Q) – головний антиоксидант у мітохондріях клітин еукаріот та тромбоцитів людини. Убіхінон активно пригнічує супероксид аніоний радикал, гідроксильний радикал, пероксидний та алкоксильний радикали, що окрім цього, перехоплює радикали токоферолу.

Аскорбінова кислота може виступати в якості донора та акцептора водню завдяки наявності у структурі молекули двох фенольних груп. Відмічається значна здатність аскорбінової кислоти пригнічувати перекисне окиснення ліпідів у водній фазі. Вона володіє широким спектром антиоксидантних властивостей: знешкоджує перхлорати, гідроокисли і т.д., відновлює альфа-токоферольний радикал. За присутності йонів заліза або купруму аскорбінова кислота стає

прооксидантом. У якості стабілізатора аскорбінової кислоти виступає сечова кислота, яка інгібує радикали аскорбінової кислоти та попереджає її окиснення залізом.

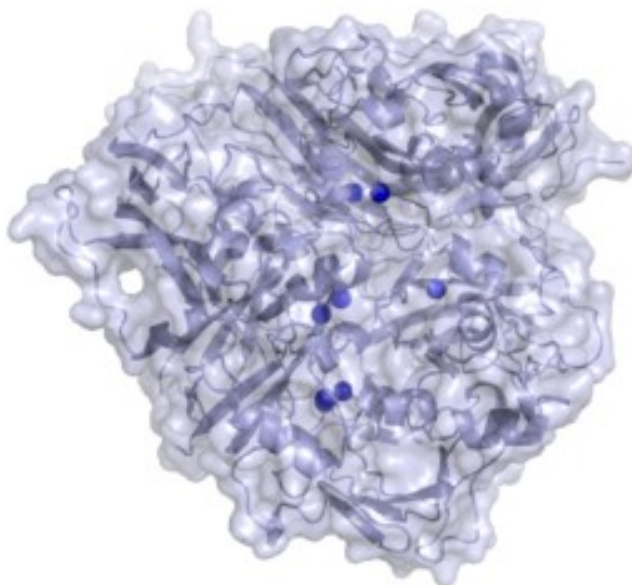
Сечова кислота за своїми властивостями належить до фенольних антиоксидантів та може виступати синергістам з радикалами альфа-токоферолу та аскорбінової кислоти. Сечова кислота здатна інгібувати синглетний кисень, гідроксильний радикал, гемові оксиданти, окрім цього її аміногрупи ефективно зв'язують йони заліза утворюючи стабільні комплекси. Завдяки високому вмісту сечової кислоти у сироватці крові деякі дослідники вважають, що на неї припадає 35-65 % захисту ліпопротеїдів від окиснення, вона також знижує активність ксантинооксидази та утворення супероксидного аніон-радикалу при окисненні гіпоксантину [38].

Більшу роль у антиоксидантному захисті організму відіграють легко окислювальні пептиди, до складу яких входять SH-вмісні амінокислоти цистеїн, цисті та метіонін.

Особливе місце серед цих пептидів займає глутатіон-трипептид, який утворений амінокислотним цистеїном, глютаміновою кислотою та гліцином, та який займає перше місце серед органічних сполук за вмістом. В організмі людини глутатіон присутній як у окисненій формі, так і відновленій. В нормі, кількість відновленого глутатіону майже у 100 разів більше, ніж окисненого. Основний антиоксидантний ефект глутатіону реалізується за рахунок його участі у роботі ферментативних антиоксидантів. Вважається, що глутатіон володіє захисними властивостями по відношенню до реплікаційної системи клітини: дефіцит відновленого глутатіону в умовах підвищеного рівня активних форм кисню призводить до зниження синтезу ДНК та білків [38].

Церуплазмін є головним купрум-вмісним білком позаклітинних рідин ссавців, який зв'язує 96% сироваткового купруму (рис. 1.4). Роль цього білку в організмі полягає в тому, що він транспортує купрум для

синтезу цитохром оксидази та іншим купрум-вмісних ферментів, мобілізації сироваткового заліза для кровотворення. Це проявляє каталітичну активність по відношенню великої кількості субстратів: йонів феруму, аскорбінової кислоти, фенолів.



**Рис. 1.4. Структурна будова молекули церулоплазміну**

Вважається, що у сироватці крові церулоплазмін разом із трансферином утворюють антиоксидантну систему, яка регулює концентрацію відновлених йонів заліза. У присутності відновлювачів з трансферину вивільняється ферум-ІІ, який окислюється церулоплазміном у ферум-ІІІ. Церулоплазмін є найбільш сильним з білків сироватки крові інгібітором утворення гіпохалогідів у системі мієлопероксидаза-пероксид-хлор. У фізіологічних умовах він більш ефективно пригнічує перхлорат, ніж трансфери, альбумін, супероксиддисмутаза або імуноглобулін. Це, скоріше за все, відіграє роль при лейкоцит-індукованому стресі. Церулоплазмін може взаємодіяти з гідроксильним радикалом та супероксидним аніон-радикалом, володіючи супероксид-дисмутазною активністю [5].

Окрім церулоплазміну халатними властивостями володіють наступні сполуки: ферітин, трансфери, молочна кислота, альбумін та деякі пептиди.

Клітини, які не справляються з задачею захисту від кисневої небезпеки і тим самим, ставлять під «удар» свій генетичний апарат, завершують самогубством, вмикаючи апоптоз, який залежить від супероксид аніон-радикалу.

**1.3.1. Кисень-залежний апоптоз.** Імовірно, за деяких несприятливих умов ешелони захисту від кисневої небезпеки виявляється неефективним. Це може мати місце, наприклад, при дефектах системи дихальних ферментів. У таких випадках різко збільшується ризик пошкодження мітохондріальної ДНК активними формами кисню. Існування клітин, які страждають на подібний дефекти, з нормальними клітинами у одній і тій самій тканині є дуже небезпечним в першу чергу через те, що це спричиняє підвищення імовірності злоякісного переродження. Для уникнення подібної ситуації клітини, які не здатні протистояти накопиченню активних форм кисню, знищуються апоптозом – особливим механізмом самознищення клітини, за якого у клітині активуються ферменти ендонуклеази, які розщеплюють ДНК на фрагменти. Відомо, що один із типів апоптозу запускається в умовах акумуляції кисневих радикалів та відповідних медіаторів [21].

#### **1.4. Інтерферонова система**

Інтерферони - це група цитокінів, які виявляють цілий спектр біологічних властивостей, включаючи пригнічення клітинної проліферації, індукцію клітинної диференціації, модулювання імунної системи, інгібування росту судин. Незважаючи на те що відкриття інтерферонів було асоційоване з їх противірусною активністю, на сьогодні добре відомо, що ці молекули володіють плейотропними (або



тими, які є неспецифічними) ефектами щодо важливих клітинних функцій, які проявляються шляхом складних сигнальних каскадів [10].

Родина інтерферонів (IFN) в даний час представлено трьома типами - IFN I типу (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\omega$ , IFN- $\tau$ , IFN- $\delta$ , IFN- $\kappa$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\zeta$  / limitin), IFN II типу (IFN- $\gamma$ ), IFN III типу (IFN- $\lambda$ 1 / IL-29, IFN- $\lambda$ 2 / IL-28A, IFN- $\lambda$ 3 / IL-28B). Взаємодія вірусної дволанцюгової РНК (длРНК) з TLR3 і цитозольними рецепторами RIG-I, MDA-5, протеїну F респіраторно-синцитіальним вірусу з TLR4, вірусної одноланцюгової РНК (олРНК) з TLR7 і TLR8, CpG бактеріальної і вірусної ДНК з TLR9 призводять до індукції синтезу IFN, які, взаємодіючи зі специфічними рецепторами клітин, активують транскрипцію інтерферонстимулюючих генів (ISG). Під регулюючим впливом IFN знаходиться транскрипція понад тисячу ISG.

Під впливом IFN I і II типу індукується синтез різноманітних білків, які забезпечують противірусні ефекти, зокрема дцРНК-залежної протеїнкінази, 2',5'-олігоаденілатсинтетаза, рибонуклеази L, РНК-специфічної аденозиндезамінази, протеїнів МхА, МхВ, скрамблази-1 фосфоліпідів. IFN- $\gamma$  також індукує синтез гуанілат-зв'язуючого протеїну, індолеамін 2,3-діоксигенази, забезпечуючи пролонгований контроль за інфекцією, викликаної як РНК, так і ДНК-вмісними вірусами.

IFN активують природні кілери, цитотоксичні Т-лімфоцити (CTL). Так, IFN I типу індукують синтез ІЛ-15, який обумовлює швидку проліферацію NK-клітин і CD8+, і сприяють диференціювання CD8+ в CTL. Під впливом IFN I типу посилюється експресія перфорину мРНК в NK-клітинах і CD8+. IFN- $\alpha/\beta$  також підсилює елімінацію вірусних агентів, активуючи механізми апоптозу заражених клітин. Елімінація заражених клітин, виконувана NK-клітинами і CTL, також регулюється IFN I типу.

*ДцРНК-залежні протеїнкінази.* Молекула серин / треонінових PKR складається з 551 амінокислотного залишку. В її N-термінальному регіоні

міститься два консервативних дцРНК-зв'язуючих домени (dsRBD1/2), з'єднаних лінкером с термінальним Ser-Thr-кіназного доменом. Ген, що кодує PKR, знаходиться на короткому плечі хромосоми 2 (2p21-p22).

У клітині PKR локалізується переважно в цитоплазмі і знаходиться в асоціації з рибосомами. У латентному стані PKR є мономером, афінним до дцРНК. Активація PKR обумовлена безпосередньою взаємодією її дцРНК-зв'язуючого домену з довгими відрізками вірусної длРНК.

Зв'язування ферменту з РНК веде до димеризації і активації аутофосфорилування, в результаті чого РНК вивільняється. Одночасно відбуваються конформаційні зміни кіназного домену, що приводять його в активний стан. Одна молекула дцРНК активує кілька молекул PKR. Рівень індукції PKR відмінний в різних клітинах і залежить від типу індукції IFN. Так, у фібробластах людини IFN не викликають індукцію PKR, в епітеліальних клітинах людини індукцію PKR викликають тільки IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ . В даний час ідентифіковано три протеїни, які беруть участь в регуляції активності PKR. Це стресіндуковані протеїни - PACT, що активує PKR; P58IP<sub>1</sub>, інгібує активність PKR; GADD34, рекрутуються протеїнфосфатаза, яка дефосфорилується, фактор ініціації трансляції eIF2 $\alpha$ -1 [37].

PKR бере участь в противірусному захисті, регулює активність внутрішньоклітинної сигнальної трансдукції, інгібує проліферацію клітин. Так, активна PKR, що представляє собою димер, фосфорилує зв'язаний з рибосомою білок P1 і  $\alpha$ -субодиницю фактора ініціації трансляції eIF-2, що обумовлює загальну супресію синтезу протеїнів, в тому числі і вірусних протеїнів. Загальна супресія протеїнового синтезу може привести до апоптотичної загибелі клітини через Bcl2- і каспазозалежний механізми. PKR бере участь у регуляції активності факторів транскрипції, вона фосфорилує інгібітор I $\kappa$ B фактора транскрипції NF- $\kappa$ B і такі фактори транскрипції, як IRF-1, STAT (*signal*

*transducer and activator of transcription*), пухлинний супресор p53, ATF3, NFAT.

*Каскад 2',5' -олігоаденілатсинтетази і рибонуклеази 1.* Іншим найважливішим механізмом реалізації противірусної дії IFN є індукція каскаду OAS-RNase L.

Молекула OAS містить длРНК-зв'язуючий і каталітичний субдомени. OAS одна з небагатьох молекул, яка активується при взаємодії з длРНК. При цьому її длРНК-зв'язуючий домен структурно значно відрізняється від такого у PKR, в зв'язку з чим деякі вірусні РНК, що блокують PKR (аденовіруси), активують OAS, що робить противірусний захист більш гнучким і ефективним [37].

Синтез OAS індуюють IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  і IFN- $\gamma$ , однак максимальний індуючий ефект на синтез OAS надає IFN- $\alpha$ 8. Гени (OAS1, OAS2 і OAS3), що кодують OAS, розташовані на довгому плечі хромосоми 12 (12q24.2). RNase L являє собою протеїн, що складається з 741 амінокислотного залишку, синтез якого може бути як конститутивним, так і індукційним. Молекула RNase L у N-термінальному регіоні містить 9 анкіриноподібних областей, що беруть участь в білково-білкових взаємодіях, а в C-термінальному регіоні - каталітичний субдомен. Синтез RNase L здійснюється практично у всіх клітинах організму і регулюється IFN- $\alpha/\beta$ . Ген, що кодує RNase L, розташований на довгому плечі хромосоми 1 (1q25).

Після взаємодії з длРНК вірусних агентів OAS олігодімеризується і, набуваючи активність, каталізує синтез ряду коротких моно-, ди-, три- і тетраполіаденілатів (2',5'-олігоаденілатів, 2-5A) на основі АТФ. Молекули 2-5A нестабільні, вони швидко деградують під дією 2', 5'-фосфодіестерази. Олігомери 2-5A асоціюються з молекулярним активатором, який в подальшому взаємодіє з N-термінальним доменом анкіринових повторів RNase L. В результаті даного комплексування молекула RNase L відчуває конформаційні зміни, які сприяють її

димеризації, а С-термінальний рибонуклеазний домен RNase L набуває каталитично активну форму. RNase L, руйнуючи мРНК на окремі фрагменти, пригнічує утворення цілісної РНК вірусів. Утворені фрагменти РНК вірусів взаємодіють з внутрішньоклітинними цитоплазматичними РНК-геліказами - продуктом гена 1, індукованого ретиноєвою кислотою, і продуктом гена 5, асоційованого з диференціюванням меланоми (MDA-5 / Ifih1 / Helicard). РНК-гелікази збуджують внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, відповідальні за індукцію синтезу IFN. RNase L гідролізує і РНК клітини макроорганізму, що може привести до загибелі зараженої клітини. Під дією активної RNase L також відбувається індукція транскрипції генів, що кодують ІЛ-8, МІС-1/NAГ-1, Р56 і ISG15, які надають не тільки безпосередньо протівірусну дію, але і в значній мірі визначають перебіг запального процесу [37].

Зокрема, ІЛ-8 забезпечує хемотаксис моноцитів, нейтрофілів, еозинофілів, Т-клітин в зону запалення; МІС-1/NAГ-1 пригнічує індукований ліпополісахаридом макрофагальний синтез TNF- $\alpha$ , індукує апоптоз клітин. Олігомери 2-5А активують синтез IFN-індуцибельного транскрипту 1/P56, IFN-індуцибельний транскрипт 2/P54, продукту гена ISG15 і трансформуючого фактора росту  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [37].

*РНК-специфічна аденозіндезаміназа.* У ссавців ідентифіковані чотири представники протеїнового сімейства ADAR - ADAR1, ADAR2, ADAR3, TENR, з яких IFN-індуцибельний синтез характерний для ADAR1. Фермент ADAR1 представлений трьома ізоформами - довгою P150 (первинним продуктом трансляції) і двома його похідними: функціонально активними короткими ізоформами P80, P110. Ізоформа ADAR1 довга P150 складається з 1226 амінокислотних залишків і характеризується наявністю в N-термінальному регіоні нетиповою послідовністю ядерного імпорту NLS,  $\zeta$ -ДНК-домену та від одного до трьох РНК-зв'язуючих доменів, а в С-кінці - каталітичного домену

дезамінази. Коротка ізоформа P80 складається з 502 амінокислотних залишків дезаміназного регіону. Ядерний експорт ADAR1p150 в цитоплазму здійснюється за участю ядерного експортного рецептора SMR1, який формує експортний комплекс з RanGTP. Особливості будови молекули довгої форми ADAR1 зумовлюють її локалізацію в цитоплазмі клітини. Коротка ізоформа P80 переміщується з ядра в цитоплазму і назад у білок, блокування ядерного експорту якого обумовлює його внутрішньоядерну акумуляцію. Ген, який кодує ADAR1, розташований на довгому плечі хромосоми 1 (1q21.1-21.2). Синтез ADAR1 індукується IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  і длРНК. Продукція ADAR1 здійснюється переважно альвеолярними макрофагами.

На початку гострих респіраторних інфекційних захворювань експресується довга форма ADAR1, яка володіє найвищим афінитетом до молекули РНК [5]. В міру розвитку інфекційного процесу відбувається перемикання синтезу довгої форми на синтез ізоформи ADAR1 - короткою P80, яка накопичується в ядрі клітини. Каталітична активація ADAR1 пов'язана з димеризацією молекули. Протеїн ADAR1, дезамінуючи аденозин, здійснює посттранскрипційну модифікацію вірусної РНК за типом «A-to-I» (аденозин в іозін), порушуючи функціонування вірусних РНК. Також ADAR1 взаємодіє з ядерним фактором NF90, викликаючи NF90-опосередковану експресію генів [37].

Протеїн MxA. Протеїн MxA належить до суперродини IFN-індуцибельних сполук з високою молекулярною масою ГТФаз, що беруть участь в везикулобульозному протеїновому сортингві. Молекула протеїну MxA складається з 662 амінокислотних залишків, в N-термінальному кінці якої міститься ГТФ-зв'язуючий мотив, а в C-термінальному регіоні - послідовності, що беруть участь в білково-білкових взаємодіях. Ген, що кодує MxA, знаходиться на довгому плечі хромосоми 21 (21q22.3). Промотор гену MxA містить не тільки інтерферон-стимульовані реагуючі елементи (ISRE), але і cis-елементи IL-

6, NF- $\kappa$ B, Sp1. Продукція MxA індукується IFN- $\alpha$  і IFN- $\beta$ . Максимальний стимулюючий ефект на синтез MxA надає IFN- $\alpha$ 1, мінімальний - IFN- $\alpha$ 8. Його основними продуцентами є моноцити і лімфоцити.

Протеїн MxA має противірусну дію на РНК-віруси - ортоміксовіруси і параміксовіруси, його ефекту достатньо для придушення вірусної реплікації навіть за відсутності інших противірусних IFN-індуцибельних протеїнів. Цитоплазматично розташований протеїн MxA, опосередковано знижуючи активність імпортину- $\alpha$ , пригнічує транспорт вірусів в ядро клітини, а ядерно-розташований протеїн MxA репресує транскрипцію вірусного генома, зокрема вірусу грипу, і пригнічує ядерний експорт вірусної РНК. Відносно недавно було встановлено, що MxA пригнічує реплікацію і ДНК-вірусів. Припускають, що протеїн MxA може взаємодіяти з мультикомпонентним комплексом конститутивного фотоморфогенезу 9, який взаємодіє з функціонально різноманітними білковими структурами - факторами транскрипції, трансляції, трансдукції сигналу, внутрішньоклітинними модифікаторами і субодиницями протеасоми [37].

*Механізм антибактеріального захисту інтерферону.* Інтерферонова система бере активну участь і в антимікробному захисті. Показано, що під дією IFN- $\gamma$  активується диференціювання моноцитів в ефекторні клітини, активуються нейтрофіли, посилюється фагоцитоз, антитілозалежна клітинна цитотоксичність за рахунок індукції експресії Fc-рецепторів. IFN- $\gamma$  підсилює бактерицидну активність фагоцитів, індукуючи синтез iNOS, субодиниць gp67phox, gp91phox NADPH-залежної оксидази фагоцитів; активує продукцію IDO; індукує синтез макрофагального протеїну, асоційованого з резистентністю (NRAMP1) і підвищує резистентність макрофагів до внутрішньоклітинних мікроорганізмів; підсилює синтез C2, C4, фактора В компонентів комплементу, експресію високоафінних Fc-рецепторів (Fc $\gamma$ RI) на мієлоїдних клітинах [14].

*Імунорегулююча дія інтерферону. Вплив на розпізнавання антигену.*

IFN- $\alpha$  в епітеліальних клітинах респіраторного тракту індукує експресію RIG-I і TLR3. Під впливом IFN- $\gamma$  посилюється експресія таких компонентів комплексу рекогніції ліпополісахаридів таких, як TLR4, MD-2 і CD14.

*Вплив інтерферонів на процесинг і презентацію антигену.* IFN індукує експресію восьми генів, продукти яких беруть участь в процесингу антигену, і шести генів, продукти яких беруть участь в презентації антигену. До першої групи входять гени, що кодують синтез пептидного транспортера протеїну ABCB2 і протеасомної субодиниці PSMB8, PSMD8, PSMA2, PSME1, PSMB10, які беруть участь в утворенні антигенних детермінант.

IFN- $\gamma$  модифікує активність 26S протеасоми (головного цитозольного комплексу, який бере участь в процесингу антигена), збільшуючи транскрипцію генів неферментативної субодиниці протеасоми, протеасомного димерного активатора (РА) 28 $\alpha$ : РА28 $\beta$ , ферментних протеасомних субодиниць LMP2 ( $\beta$ 1i), MECL1 ( $\beta$ 2i) і LMP7 ( $\beta$ 5i), які селективно замінюють відповідно протеасомною субодиницею  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 і  $\beta$ 5. Індуцібельна заміна протеасомної субодиниці, ймовірно, є механізмом IFN- $\gamma$ , який дозволяє збільшити рівень інтенсивності та різноманітності презентуючих епітопів і посилити імунний нагляд [37].

Після протеасомної обробки пептиду антигену спільно з продуктами системи HLA презентуються на поверхні мембрани антигенпрезентуючих клітин. IFN I і II типів, змінюючи транскрипцію генів-мішеней, активують синтез продуктів системи HLA I і II класів. Продукти HLA I класу беруть участь у взаємодії антигенпрезентуючими клітинами з Т-кілерами, продукти HLA класу II - з Т-хелперами. IFN- $\gamma$  активує синтез продуктів HLA II класу (CD74), коактиватора імунних комплексів,  $\beta$ 2-мікроглобуліну дендритними клітинами, макрофагами.

IFN- $\gamma$  активує синтез IFN- $\gamma$ -індуцібельного транспортеру, асоційованого з процесингом антигену, TAP, який транспортує утворені в результаті протеасомної деградації пептиди в ендоплазматичний ретикулум, де відбувається асоціація з продуктами системи HLA, забезпечуючи ефективність презентації епітопів.

У той же час IFN- $\gamma$  повністю пригнічує антигенпрезентуючу здатність тучних клітин респіраторного тракту. Показано, що тучні клітини можуть функціонувати як антигенпрезентуючі клітини, індукуючи Th2-відповідь, тільки за відсутності IFN- $\gamma$ .

IFN- $\gamma$  підсилює експресію костимулюючих молекул CD80, CD86, необхідних для активації T-лімфоцитів; індукує експресію маркера дендритних клітин CD83, раннього маркера активації T-і B-лімфоцитів CD63 на мембранах поліморфноядерних лейкоцитів. IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  посилюють експресію костимулюючих молекул (CD40, CD80 і CD86) незрілими мієлоїдними дендритними клітинами [37].

Відомо, що розпізнавання T-лімфоцитами комплексу антигенного пептиду/молекули HLA системи призводить до порушення T-клітин, а взаємодія молекулярних структур T-лімфоцитів і B-лімфоцитів (CD28 з CD80; CD2 з CD58; CD11 $\alpha$  / CD18 з ICAM-1, -2, -3; CD40L с CD40) - до активації останніх.

*Вплив інтерферону на трансдукцію внутрішньоклітинного сигналу.* IFN індукують 53 гена, що беруть участь в модуляції різних внутрішньоклітинних сигнальних шляхів. Зокрема, під впливом IFN посилюється продукція JUN, RELA, , MAP3K8, TRADD, G-протеїнів, малих, несамостійних ГТФаз - RAN, протеїну RANBP1, NET1A, GEM, що беруть участь в різноманітних внутрішньоклітинних реакціях - ремоделюванні цитоскелету, везикулярного транспорту, ядерно-цитоплазматичного транспорту, рості клітини. IFN- $\gamma$  індукує синтез адаптерного протеїну MyD88 і IL-1R-асоційованих серин / треонінових протеїнкіназ (IRAK) [37].



*Вплив інтерферону на активацію факторів транскрипції.* IFN, індукуючи сигнальні білки, беруть участь в регуляції діяльності 37 факторів транскрипції, 30 з яких активують і 8 інгібують. Так, показано, що IFN беруть участь в процесах індукції факторів транскрипції STAT1, STAT2, ISGF3- $\gamma$ , IRF1, IRF2, IRF3, IRF4, IRF5, і IRF7, HIF1 $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, T-Bet.

Разом з тим, інтерферони індукують гени, які беруть участь в регуляції посттранскрипційної модифікації. Під впливом IFN індукується синтез факторів ініціації і елонгації і трансляційних інгібіторів (IFN-індуцибельного 56K (IFI56 і PKR).

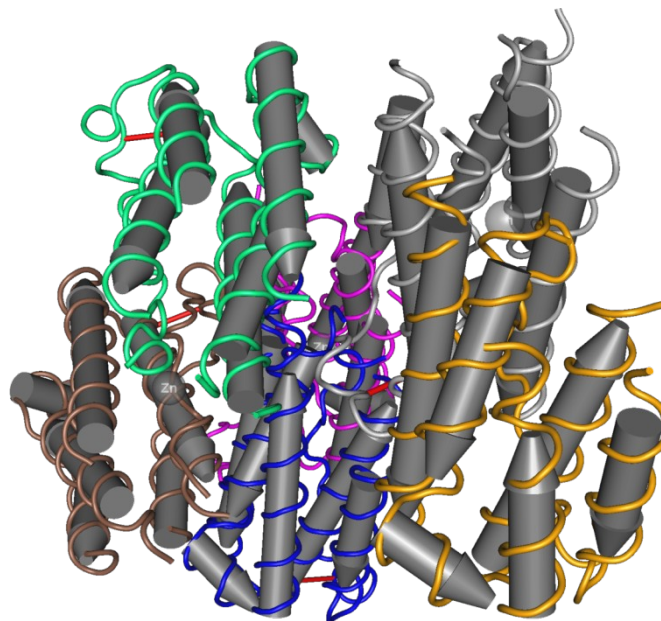
Порушення, що виникають на рівні клітинної регуляції, можуть призводити до розвитку вкрай несприятливих станів, таких як онкологічна патологія і т.д. Тому до клітинної регуляторної системи слід підходити вкрай обережно, щоб випадковий вплив не спричинив тяжких наслідків [37].

Історія відкриття інтерферонів також досить цікава: вперше вчені замислилися над тим, що мають справу з невідомою раніше реакцією організму, коли декілька японських вірусологів Ясу-ічі Нагано (Yasu-ichi Nagano) і Ясухико Яким (Yasuhiko Kojima), які працювали в Інституті інфекційних захворювань при університеті Токіо, в пошуку більш ефективної вакцини проти віспи виявили інгібування вірусного розмноження в області шкіри і яєчок кролика, які були попередньо оброблені інактивованими ультрафіолетом вірусом. Результати подальших досліджень в цьому напрямку були опубліковані в наукових журналах, але з якихось причин не отримали належного визнання серед наукової спільноти.

У той же час британський вірусолог Алік Ісаак (Alick Isaacs) і швейцарський дослідник Джин Лінденман (Jean Lindenmann) в Національному інституті медичних досліджень у Лондоні звернули увагу на інтерферуючий ефект, до якого призводить інактивований теплом

вірус грипу щодо зростання нормальних вірусних частинок в хоріоналантаїсній оболонці курячого яйця. Результати цих досліджень опубліковані у 1957 році. Тоді вчені вперше використали термін «інтерферон», і сьогодні цей специфічний агент відомий як інтерферон першого типу.

З того часу почався період розквіту інтерферонів. По всьому світу вчені досліджували їх функції, а також займалися питаннями, пов'язаними з їх практичним застосуванням. Слід зазначити, що доступність терапії інтерферонами помітно зросла разом з розвитком методів генної інженерії, і до початку 80-х років ХХ ст. це були дуже дорогі субстрати (рис. 1.5).



**Рис. 1.5. структурне зображення молекули інтерферону**

Інтерферони діляться на 2 основних типи – першого і другого. В межах кожного з них структурна гомологія висока, але між ними вона мінімальна. Інтерферони здійснюють свій біологічний вплив завдяки взаємодії з рецепторами, розташованими на поверхні клітин [37].

Внаслідок широкого спектру функцій інтерферони знайшли своє застосування в терапії аутоімунних порушень, неврологічних синдромів та вірусних інфекцій. Агенти, які активують імунну систему (наприклад

малі молекули іміквімода, що активують TLR7), індукують утворення інтерферону-альфа. Іміквімод - головний інгредієнт крему Альдар, який має допуск на ринок США і застосовується для терапії актінічного кератозу, поверхневої базально-клітинної карциноми, папіломи та інших захворювань. Деякі дослідження продемонстрували, що антипроліферативна властивість іміквімода абсолютно не залежить від функціонування імунної системи: ця молекула здійснює свій вплив шляхом підвищення рівня рецептора опіоїдного фактору росту [37].

Інтерферони застосовуються також для лікування аутоімунних захворювань, таких як множинний склероз. Інтерферонову терапію в комбінації з хіміо-та променевою терапією застосовується при різних видах онкологічної патології. Найбільш широке застосування вона знайшла при лікуванні гематологічних пухлинних утворень, таких як лейкоз, хронічна мієлоїдна лейкоз і т.п.

Інтерферони знайшли широке визнання і в лікуванні гепатитів (В і С), часто - в комбінації з іншими противірусними агентами. У багатьох випадках застосування схем лікування, що містять інтерферони та інші противірусні агенти, вдається досягти досить хорошої клінічної відповіді.

У США і країнах ЄС інтерферони не застосовують за ГРВІ. Крім того, деякі вчені скептично ставляться до ефективності такої терапії. Однією з причин цього вважається необхідність введення набагато більших доз. Так, для того щоб увведений інтерферон мав противірусну активність, необхідно, щоб його концентрація в крові була не нижчою, ніж 100 од./Мл. Для створення такої концентрації інтерферону в крові людини і тварин слід вводити його в дозі  $2 \cdot 10^5 \cdot 10^5$  од. / Кг маси тіла.

Інтерферони як молекули дуже широкого спектру дії просто не можуть не володіти побічними реакціями. Вони варіюють від незначних: таких як підвищення температури тіла, головний і м'язовий біль, до досить серйозних, пов'язаних з проявом імуносупресивних реакцій (нейтропенія) і підвищенням ризику суїциду.

Таким чином, необхідно розуміти, що, оскільки інтерферони володіють яскраво вираженим впливом на клітини, їх ні в якому разі не можна розглядати як агенти, які позбавлені побічних явищ для організму. І, не дивлячись на їх широке застосування в якості ефективних фармацевтичних субстанцій при терапії різних видів захворювань, точний механізм дії інтерферонів все ще залишається туманним.

Те, що в даний час, з урахуванням досягнень науки і техніки, залишаються серйозні пробіли в розумінні механізму дії цих цитокінів, відображає складність їх роботи в людському організмі. Тому інтерферони знайшли широке застосування в лікуванні таких важких патологій, як гепатити, пухлини. Важливо відзначити, що показань до їх застосування при грипі у багатьох країнах відсутня.

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1. Організація дослідження

Для реалізації поставлених задач було організовано дослідження наступним чином. Із групи лабораторних мишей чоловічої статі було сформовано дві групи – контрольна та експериментальна.

Експериментальна група отримувала тричі на тиждень (у понеділок, середу та п'ятницю) розчин рекомбінантного інтерферону альфа (виробник ЗАТ «Біофарма», Україна). Дозування було розраховано таким чином, що на одну тварину припадало 10 000 міжнародних одиниць активності.

Контрольна група отримувала підшкірні ін'єкції за аналогічною схемою проте фізіологічного розчину. Через тиждень (приблизно 3 ін'єкції) у тварин брало зразки крові із хвостової вени (рис. 2.1) [18].



**Рис. 2.1. Взяття крові у лабораторної тварини**

Для взяття крові хвіст підігрівався у теплій воді та після розширення судин робили надріз кінчика хвоста з подальшим збором крапель крові у пробірку з антикоагулянтом цитратом натрію.

## 2.2. Метод оцінки продуктів ТБК у еритроцитах

Про інтенсивність преребігу перекисного окиснення ліпідів судили за допомогою визначення вмісту у еритроцитах (точніше їх мембранах) продуктів деградації полінасичених жирних кислот, що являють собою похідні тіобарбітурової кислоти – малонового діальдегіду [11, 20].

Для визначення вмісту ТБК-активних продуктів відбирали у досліджуваних тварин зразки крові. Після цього їх відмивали не менше трьох разів холодним фізіологічним розчином до тих пір, поки середовище не стало прозорим . Отриману завись еритроцитів у об'ємі 0.1 мл помістили до пробірки. Після цього додали 2 мл дистильованої води. Через декілька хвилин спостерігали за утворенням гемолізу та забарвлення усієї рідини у пробірці у червоний колір [21].

До отриманого розчину зруйнованих (гемолізованих) еритроцитів додавали розчин трихлороцтової кислоти (приблизно 1 мл) та такий самий об'єм розчину тіобарбітурової кислоти. Після відповідного перемішування пробірку поміщали до киплячої водяної бані на 10 хвилин. Після цього проводили центрифугування пробірок з цими розчинами протягом 10 хвилин при кількості обертів 3000 за хвилину [12].

Через деякий час отриману суміш, яка забарвилася, вимірювали за довжини хвилі 540 нм. Для цієї мети використовували кювету шириною 10 міліметрів. Вимірювання здійснювалося проти холостої проби. Холоста проба складалася з фізіологічного розчину .

Для визначення вмісту (*мкмоль/л*) досліджуваних продуктів у розчині використовували формулу [29]:

$$C = \frac{E \times 10^6 \times 3}{1,56 \times 10^5},$$

При цьому,  $E_{on}$  – показник оптичної щільності досліджуваної проби;  $10^6$  – коефіцієнт переведу «моль/л» у «мкмоль/л»;  $1,56 \cdot 10^5$  – показник коефіцієнта молярної екстинкції.

### 2.3. Визначення активності супероксиддисмутази

Метод визначення активності супероксиддисмутази заснований на тому, що дослідником визначається кількість продукту окиснення адреналіну (епінефрину). При цьому, адреналін має здатність поглинати світловий промінь у фотоелектроколориметрі у межах 347 нм [35]. Це поглинання за відсутності додаткових вільних радикалів чутливе до присутності супероксиддисмутази.

Готували гемолізований розчин еритроцитів. Також проводили центрифугування. Процес аутоокиснення адреналіну реєстрували наступним чином: до 2 мл карбонатного буферу додавали 100 мкл 0.1 % розчину епінефрину, швидко перемішували та виміряли величину оптичної щільності через кожні 30 секунд протягом 5 хвилин.

Таким чином, до кювети з буферним розчином додавали 10 мкл досліджуваної рідини та 100 мкл 0.1% адреналіну. Після змішування цих сполук здійснювали перемішування та визначали наростання оптичної щільності [27].

Для отримання контрольної проби використовували також кювету із аналогічним набором реагентів проте без внесення адреналіну. Про активність супероксиддисмутази у зразках крові судили за ступенем активності інгібування ним швидкості аутоокиснення адреналіну. Процент інгібування розраховували за формулою: % інгібування (одиниці активності) =  $[1 - (D \text{ досліду} / D \text{ контроль})] \cdot 100\%$ . При цьому  $D$  досліду та  $D_{\text{контроль}}$  є показниками швидкості реакції аутоокиснення адреналіну за присутності або відсутності проби відповідно. Про швидкість окиснення адреналіну судили за показником зміни оптичної щільності [36].

## 2.4. Визначення активності каталази

Визначення активності каталази здійснювали методом з використанням молібдату амонію. У досліді застосовували холосту, контрольну та дослідну пробу [1, 7]. До кожної пробірки вносили 1 мл розчину трис-хлоридна кислота. Після цього до обох пробірок вносили по 2 мл перекису водню. До контрольної – 2 мл дистильованої води. Після цього, до контрольної пробірки вносили дистильовану воду (замість перекису водню). До обох пробірок вносили гемолізати. Через 10 хвилин до усіх пробірок додавали по 1 мл розчину молібдату амонію.

Після того, як було розвинено зафарбовування у досліджуваних пробірках, на фотоелектроколориметрі визначали активність каталази. Вимірювали проводили за довжини хвилі 410 нм проти контрольного зразку. Активність розраховували за наступною формулою [36]:

$$A = \frac{(E_x - E_0) * V_{pc}}{t * K * V_{пр} * d * B}$$

A – активність мкмоль  $H_2O_2$ /хв\*г білку

$E_x$  – зміна оптичної щільності холостої, контрольної проби за 10 хв.

$E_0$  – зміна оптичної щільності досліджуваної проби за 10 хв.

$V_{pc}$  – об'єм досліджуваного розчину;

t – час, за який реєстрували оптичну щільність (10 хв).

K – коефіцієнт мікромолярної екстинкції для перекису водню, який за цієї довжини хвилі сягає  $22,2 \times 10^{-3} \text{ мкМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ .

$V_{пр}$  – об'єм проби.

d – довжина оптичного шляху кювети (0,5 см).



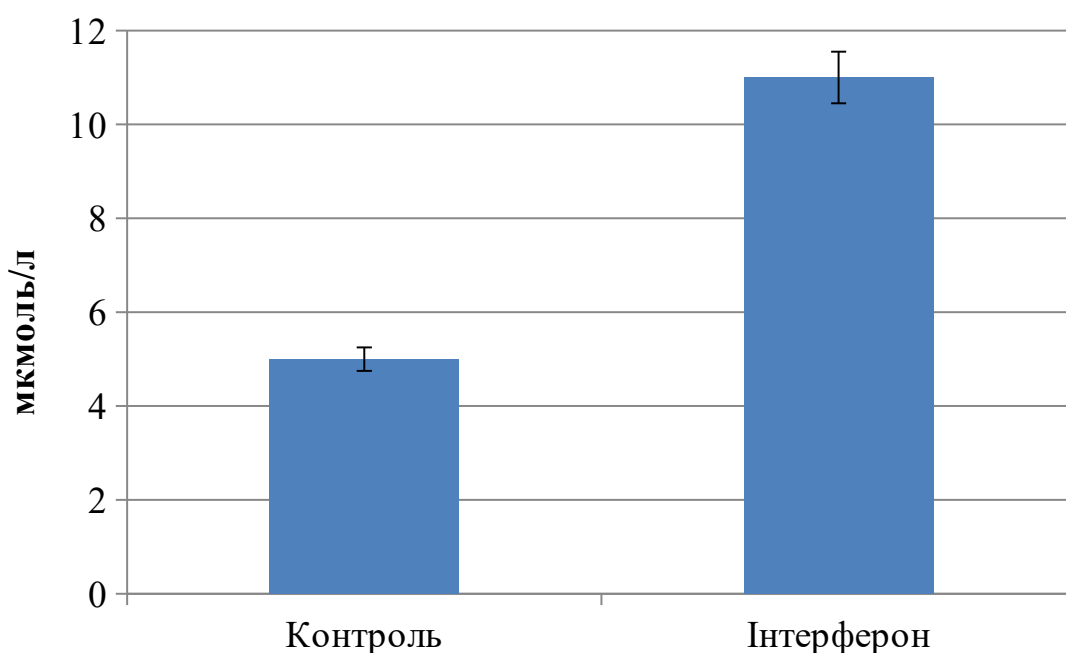
## РОЗДІЛ 3.

### АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

#### 3.1. Показники вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів

Як вже було зазначено у огляді літератури, продукти окиснених ліпідів відіграють важливу роль у прооксидантно-антиоксидантному гомеостазі клітини. Надійним джерелом для визначення вмісту продуктів окисної модифікації ліпідів у стінках клітинних мембран є еритроцити, а точніше – їхні тіні, які було утворено після лізису дистильованою водою [42].

Після проведених досліджень активності ТБК продуктів у еритроцитах крові досліджуваних груп було встановлено наступне (рис. 3.1)



**Рис. 3.1. Порівняння показників продуктів малонового діальдегіду в еритроцитах досліджуваних груп**

У групі тварин, які отримували розчин інтерферону, спостерігається збільшення рівня малонового діальдегіду у 2 рази у порівнянні з контрольною групою.

Як відомо, малоновий діальдегід виникає за умови деградації поліненасичених жирних кислот активними формами кисню та слугує маркером пероксидного окиснення жирів та оксидативного стресу. При цьому, малоновий діальдегід здатен реагувати з нуклеїновими кислотами.

Таким чином, можна стверджувати, що інтерферони, які виконують захисну роль в організмі, спричиняють збільшення рівня продуктів перекисного окиснення ліпідів у клітинах про що свідчить підвищення їхнього рівня у групі тварин, які отримували високу дозу інтерферону.

### 3.2. Показники активності супероксиддисмутази у досліджуваних групах

На тлі високих концентрацій малонового діальдегіду у групі тварин, які отримували високі дози інтерферону, активність супероксиддисмутази у еритроцитах цієї групи показала протилежні результати (рис. 3.2).

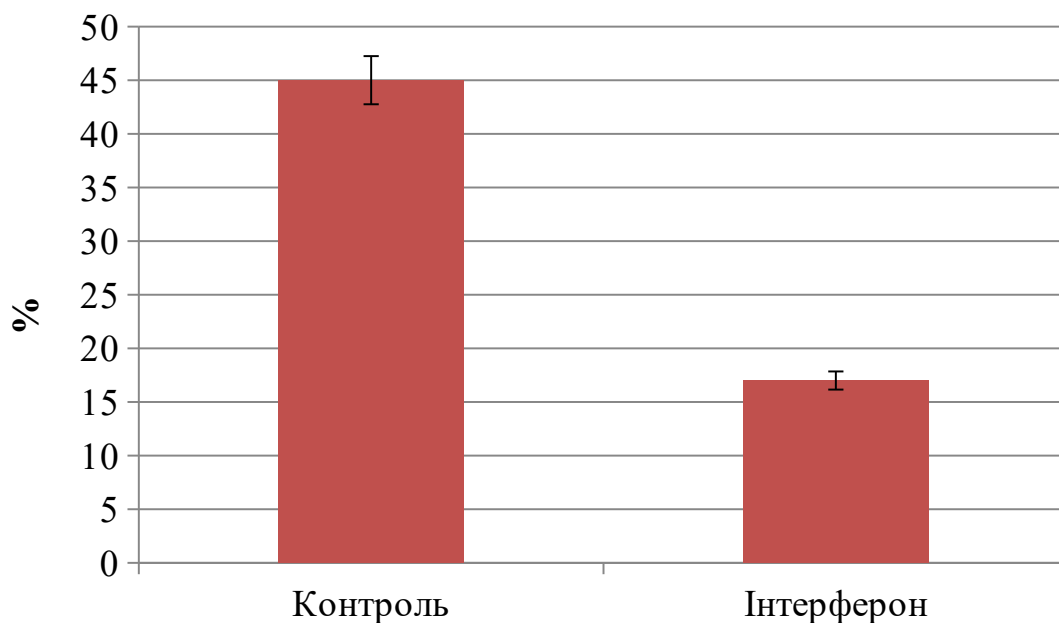


Рис. 3.2. Порівняння показників активності супероксиддисмутази у еритроцитах досліджуваних груп

Активність супероксиддисмутази еритроцитів дослідних груп показала наступну властивість – рівень її активності у групі тварин (які зазнавали впливу високої концентрації інтерферону) є значно зниженою. У групі тварин, які отримували ієскції рекомбінантного інтерферону рівень активності супероксиддисмутази знижений на 28%.

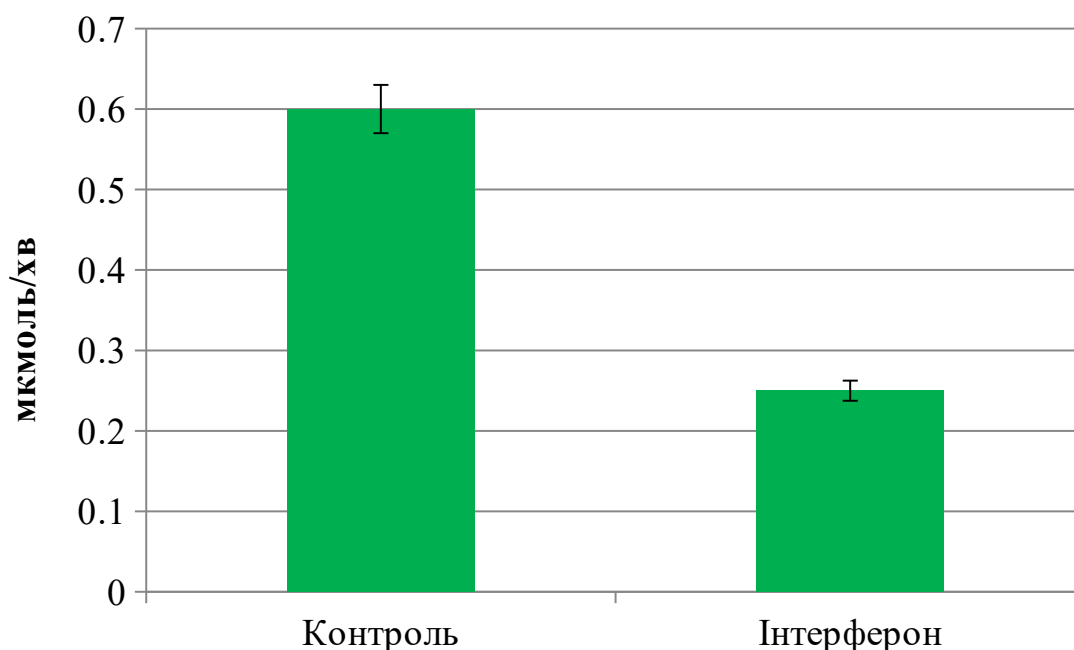
Супероксиддисмутаза належить до групи антиоксидантних ферментів, які разом із каталазою й іншими антиоксидантними ферментами здійснює захист клітин від надмірно токсичних вільних радикалів кисню. Цей фермент здійснює посилення переходу кисню у кисень та пероксид водню. Тим самим, цей фермент відіграє важливу роль у антиоксидантному захисті організму.

Отримані результати дослідження дозволяють стверджувати, що уведення надмірно високих доз інтерферонів спричиняє зниження активності супероксиддисмутази та відповідно, підвищення вільнорадикального кисню в клітинах.

### **3.3. Рівень активності каталази еритроцитів під впливом інтерферону**

Відповідно, каталаза є ферментом, який посилює розкладання пероксиду водню, який утворюється у процесі життєдіяльності клітини. Разом з тим, цей фермент здатен окиснювати у присутності пероксиду водню деякі низькомолекулярні спирти та нітроти, бере участь у тканинному диханні.

Проведене дослідження активності каталази у групі тварин, які отримували ін'єкції інтерферону показали зниження показників активності на 0.35 мкмоль/хв. (рис. 3.3).



**Рис. 3.3. Порівняння показників активності каталази у еритроцитах досліджуваних груп**

У групі тварин, які отримували ін'єкції інтерферону, зниження рівня каталазної активності у еритроцитах свідчить про переважання оксидативної ланки. Оскільки цей фермент відповідає за перетворення активних радикалів кисню у нешкідливі форми, то цілком імовірно можна стверджувати, що пригнічення активності цього ферменту вказує на підвищену реактогенність внутрішнього середовища клітини. Скоріше за все, зазначене зниження протиоксидантних ферментів може бути допоміжним механізмом у подоланні клітинами організму вірусного зараження (оскільки інтерферони відіграють провідну роль у протівірусному захисті).

## ВИСНОВКИ

1. Активні форми кисню є високореактивними, сполуками, що утворюються у живих організмах в результаті неповного відновлення молекулярного кисню або зміни спіну одного з його електронів, який перебуває на його зовнішніх орбіталях. Вони відіграють важливу роль у регуляції клітинної проліферації та тонуусу судин, індукції транскрипції певних генів. Активні форми кисню у клітинах виникають внаслідок оксидазних, оксигеназних, гіпоксантин-ксантинооксидазних реакцій, аутоокиснення гемоглобіну, системи фагоцитозу та роботи пероксидом. Продукти окиснених ліпідів відіграють важливу роль у прооксидантно-антиоксидантному гомеостазі клітини.

2. Інтерферони відіграють важливу роль у процесах пригнічення клітинної проліферації, індукції клітинної диференціації, модулювання імунної системи, інгібування росту судин. Ці молекули мають противірусні властивості, що дозволяє застосовувати їх у медицині. Ці сполуки також мають багато інших додаткових властивостей, які не пов'язані з імунною системою.

3. У еритроцитах лабораторних тварин, які отримували інтерферон у високій концентрації, спостерігалось підвищення вмісту малонового діальдегіду у два рази в порівнянні з еритроцитами тварин контрольної групи. Малоновий діальдегід, який утворюється внаслідок деградації поліненасичених жирних кислот активними формами кисню, є маркером пероксидного окиснення жирів та оксидативного стресу.

4. Було встановлено, що активність супероксиддисмутази у еритроцитах тварин, які зазнавали впливу інтерферону була значно зниженою на 28% у порівнянні з контрольною групою. Оскільки супероксиддисмутаза відіграє важливу роль у антиоксидантному захисті організму, можна стверджувати, що дія інтерферону спричиняє збільшення рівня вільних радикалів у клітинах.

5. З'ясовано, що уведення високої дози інтерферону спричиняло зниження активності каталазної активності еритроцитів на 0.35 мкмоль/хв. Зниження рівня каталазної активності у еритроцитах вказує на превалювання оксидативної ланки. Оскільки цей фермент відповідає за перетворення активних радикалів кисню у нешкідливі форми, то цілком імовірно можна стверджувати, що пригнічення активності цього ферменту вказує на підвищену реактогенність внутрішнього середовища клітини.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Авцын А.П. Микроэлементозы человека / А.П. Авцын, А.А. Жаваронков, М.А. Риш. – М. : Медицина, 1991. 496 с.
2. Булыгина А.С. Некоторые физико-химические свойства крови. *В мире научных открытий: материалы Всероссийской студенческой научной конференции (с международным участием). 23-25 мая 2017 г.-Ульяновск: УлГАУ. 2017. Том III. Часть 1. УлГАУ, 2017.*
3. Божко А.П., Городецкая И.В., Солодков А.П. Ограничение стрессорной активации перекисного окисления липидов малыми дозами тиреоидных гормонов. *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* 1990. Т. 109. № 6. С. 539–541.
4. Бесчасний С.П., Найдьонов М.М., Гасюк О.М. Реакція мастоцитів на перфузію серця розчином інтерферону. *Природничий альманах (біологічні науки).* 2015. №22. С. 4-10. URL: <http://na.kspu.edu/index.php/na/article/view/449>
5. Бесчасний С.П., Гасюк О.М., Речицький О.Н. Активність мієлопероксидази лейкоцитів білих мишей за умови впливу спірокарбону. *Теорія і практика сучасного природознавства: V Всеукр. наук, -практ. конф.* 2011. С. 28-32.
6. Вартамян Л.С., Гуревич С.М. Влияние ионола на метаболизм супероксидных радикалов в печени мышей. *Вопросы мед. химии.* 2000. №4. С. 34-38. URL: <http://pbmc.ibmc.msk.ru/ru/article-ru/PBMC-1999-45-4-314/>
7. Гаранина Е.Н. Качество лабораторного анализа. Факторы, критерии и методы оценки. М.: Лабинформ, 1997. 192 с. URL: <https://search.rsl.ru/ru/record/01001766018>
8. Глузман Д.Ф., Авраменко И.В., Скляренко Л.М., Надгорная В.А. Лабораторная диагностика онкогематологических заболеваний. - К., 1998. 334 с.

9. Гуніна Л.М., Носач О.В. Метаболічні аспекти впливу фізичних навантажень: оксидативний стрес та адаптація. *Український журнал клінічної та лабораторної медицини.* – 2012. -7, № 4. – С. 237-243.
10. Державна фармакопея України. - 1-ше вид. Доповнення. - Х.: РІРЕГ, 2004.
11. Дотхоев Д.С. Особенности проницаемости эритроцитарных мембран и сорбционная способность эритроцитов у здоровых доношенных детей и их матерей. *Физиология человека.* 1998. Т.24. №2. С.135-137.
12. Кишкун А.А. Клиническая лабораторная диагностика: Учебное пособие для медицинских сестер. М: ГЭОТАР-Медиа. 2008. 720 с.
13. Кишкун А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики. – М: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 800 с.
14. Клинический диагноз - лабораторные основы / Под ред. В. В. Меньшикова. М.: Лабинформ, 1997. 320 с.
15. Кульцицкий О.К., Потапенко Р.И., Новикова С.Н. Особенности пероксидного окисления липидов в тканях головного мозга и печени старых крыс при стрессе. *Укр. біохім. журн.* 2001. Т. 73. №4. С. 73.
16. Лазебник Л.Б., Ильченко Л.Ю. Возрастные изменения печени (клинические и морфологические аспекты). *Клиническая геронтология.* 2007. №1. С. 3-8.
17. Лушак В.І., Багнюкова Т.В., Лужна Л.І. Показники оксидативного стресу. 2. Пероксиди ліпідів. *Укр. біохім. журн.* 2006. 78.5. С. 113-119. URL: <http://ubj.biochemistry.org.ua/index.php/journal-archiveac/ww2006/6-vvv/4086-2>
18. Манухина Е.Б., Бондаренко Н.А., Бондаренко О.Н. Влияние различных методик стрессирования и адаптации на поведенческие



- и соматические показатели у крыс. *Бюл. эксперим. биол. мед.* 1999. Т. 129, № 8. С. 157–160.
19. Мурадян Х.К. Коррелятивные связи между активностью супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы печени мышей. *Укр. біохім. журн.* 2003. Т. 75. №1. С. 33–37.
20. Меньшиков В.В. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / В.В. Меньшиков.- М.: Медицина, 1987.- 460с.
21. Михайлович В.А., Марусанов В.Е., Бичун А.Б. Проницаемость эритроцитарных мембран и сорбционная способность эритроцитов - оптимальные критерии тяжести эндогенной интоксикации *Анестезиология и реаниматология.* 1993. №5. С.66-69.
22. Орлова Е.А., Лазарчук О.А. Влияние парафармацевтика «ВинВита» на уровень метаболитов оксида азота в тканях органов молодых и взрослых крыс. *Український журнал клінічної та лабораторної медицини.* 2010. Т.13. №2. С. 124-128.
23. Орлова О.А., Лазарчук О.О. Активність окислювальної модифікації білків у різних тканинах дорослих щурів під впливом парафармацевтика «Він-Віта». *Український журнал клінічної та лабораторної медицини.* 2009. Т.4. №4. С. 86-90.
24. Павлова О.Н., Гуленко О.Н., Каримова Р.Г., Борискин П.В., Девяткин А.А., Никитин А.Г., Тороповский А.Н. Взаимосвязь распределения концентрации малонового диальдегида в сыворотке крови и тканях экспериментальных животных. *Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана.* 2019. № 238(2). С. 150-154.
25. Попова Т.Н., Сафонова О.А., Столярова А.О. Оксидативный статус тканей крыс при введении мелаксена на фоне развития ишемии/реперфузии головного мозга. *Биомедицинская химия.* – 2016. № 62(5). С. 561-565.

26. Пеклина Г.П., Бабов К.Д. Исследование действия «Вин-Вита» на перекисное окисление липидов и антиоксидантную систему организма у ликвидаторов последствий Чернобыльской аварии. *Медична реабілітація. Курортологія. Фізіотерапія*. 2000. №2. С. 24-32.
27. Пустовалова Л.М., Никанорова И.Е. Техника лабораторных работ. Ростов н/Д.: «Феникс», 2004. 288 с.
28. Справочник биохимика: Пер. с англ. / Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К.- М.: Мир, 1991. 544 с.
29. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида. *Современные методы в биохимии*. М. Просвещение. 1977. С. 66-68.
30. Симонова Н.А., Маковийчук Т.В., Мехед О.Б., Коваль В.А. Содержание малонового диальдегида в тканях карпа в условиях воздействия поверхностно-активных веществ. *Животноводство и ветеринарная медицина*. 2019. №1. С. 32-37. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/soderzhanie-malonovogo-dialdegida-v-tkanyah-karpa-v-usloviyah-vozdeystviya-poverhnostno-aktivnyh-veschestv>
31. Тогайбаев А.А., Кургукин А.В., Рикун И.В., Карибжанова Р.М. Способ диагностики эндогенной интоксикации. *Лабораторное дело*. 1988. №9. С.22-25.
32. Цвях О.О., Чеботар Л.Д. Оксидативний стрес у тканинах шлунка щурів при моделюванні гастропатій на тлі нестачі та надлишку мелатоніну. *Буковинський медичний вісник*. 2016. № 20.3 (79). С. 190-196. URL: [http://www.irbis-nbuv.gov.ua/cgi-bin/irbis\\_nbuv/cgiirbis\\_64.exe?C21COM=2&I21DBN=UJRN&P21DBN=UJRN&IMAGE\\_FILE\\_DOWNLOAD=1&Image\\_file\\_name=PDF/bumv\\_2016\\_20\\_3\\_45.pdf](http://www.irbis-nbuv.gov.ua/cgi-bin/irbis_nbuv/cgiirbis_64.exe?C21COM=2&I21DBN=UJRN&P21DBN=UJRN&IMAGE_FILE_DOWNLOAD=1&Image_file_name=PDF/bumv_2016_20_3_45.pdf)
33. Шевченко І.Л. Техніка лабораторних робіт. - Х.: Вид-во НФаУ:

Золоті сторінки, 2003. 108 с.

34. Швець В.А., Гасюк О.М. Участь цитокінів у адаптаційних реакціях (огляд літератури). *Природничий альманах (біологічні науки)*. – 2020. №27. С. 145-161. URL: <http://na.kspu.edu/index.php/na/article/view/581>
35. Юзик Г.Ю. Техніка лабораторних робіт: навч. посіб. - К.: Медицина, 2007. - 144 с.
36. Beutler E. Red cell metabolism a manual of biochemical methods / E. Beutler.- Grune & Stratton, Orlando, 1990.- P.131-134.
37. Kuznietsov S.V. Interferon Therapy of Acute Respiratory Viral Infections in Children / S.V. Kuznietsov, T.S. Kopeichenko // *Actual infectology*. – 2016. - 1.10. – P. 48-50.
38. Kosenko E.A. Portacaval shunting causes differential mitochondrial superoxide production in brain regions / E.A. Kosenko, L.A. Tikhonova, G.A. Alilova, C. Montoliu, G.E. Barreto, G. Aliev, Y.G. Kaminsky // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2017. - № 113. – P. 109-118.
39. Paul C., West P.K. Zinc deficiency can also impair absorption, transport, and metabolism of vitamin A because it is essential for the synthesis of the vitamin A transport proteins and as the cofactor in conversion of retinol to retinal. *Am. J.Clin. nutr.* 1998. № 68. P. 435– 441.
40. Tkachenko H. Oxidative Stress Biomarkers in Liver of Sea Trout (*Salmo trutta m. trutta* L.) affected by Ulcerative Dermal Necrosis Syndrome / H. Tkachenko, N. Kurhaluk, A. Andriichuk, E. Gasiuk, S. Beschasniu // *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2014. 14. P. 391-402. URL: <http://www.trjfas.org/abstract.php?lang=en&id=78>
41. Thyroid hormone increases astrocytic glutamate uptake and protects astrocytes and neurons against glutamate toxicity / C.B. Mendes - de-Aguiar [et. al.] *J. Neurosci. Res.* 2008. Vol. 86, № 14. P. 3117–3125.
42. Wrutniak-Cabello C., Casas F., Cabello G. Thyroid hormone action in

mitochondria. *J. Mol Endocrinol.* 2001. Vol. 26, № 1. P. 67–77.