

УДК 612.173: 612.174
№ держреєстрації: 0117U005021

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
вул. Шевченка, 14, м. Івано-Франківськ, 76000. Тел. +380963102636;
e-mail: office@ksu.ks.ua; <http://www.kspu.edu>

ЗАТВЕРДЖУЮ

Ректор Херсонського
державного університету



Олександр СПИВАКОВСЬКИЙ

ЗВІТ ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

ДОСЛІДЖЕННЯ МЕХАНІЗМІВ ПЛЕЙОТРОПНОГО ВПЛИВУ
РЕКОМБІНАНТНОГО ІНТЕРФЕРОНУ АЛЬФА НА ОРГАНІЗМ
(заключний)

Перший проректор
д.пед.н., професор

A blue ink signature of Serhii Omelchuk.

Сергій ОМЕЛЬЧУК

Науковий керівник НДР
к.б.н., доцент

A blue ink signature of Serhii Beschasnyi.

Сергій БЕСЧАСНИЙ

Івано-Франківськ – Херсон

2023

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР,
доцент кафедри
біології людини та імунології



С.П. Бесчасний

АНОТАЦІЯ

Об'єкт дослідження – активність актин-міозинового комплексу м'язів в умовах дії інтерферонів з різною біологічною активністю.

Мета роботи – полягає у вивченні дії рекомбінантних інтерферонів з різною біологічною активністю на актин-міозиновий комплекс м'язів.

Методи дослідження. Для оцінки впливу інтерферонів на функціонування актин-міозинового комплексу було застосовано колориметричні та біохімічні методи. Отримані дані аналізувалися за допомогою методу непараметричної статистики, з використанням критерію Мана-Уїтні.

У роботі було досліджено не імунологічний вплив рекомбінантних препаратів інтерферону. Зокрема, вперше було визначено АТФ-азну активність актин-міозинового комплексу та вміст креатинфосфату в м'язах під впливом імунобіологічного препарату. Вперше показано, що під дією високих концентрацій рекомбінантних інтерферонів відбувається зниження кількості макроергічних сполук у м'язах. Встановлена закономірність, що пояснює побічні ефекти дії препаратів інтерферонів, особливо під час застосування високих терапевтичних доз. Таким чином, вперше встановлено, що введення інтерферонів з високою біологічною активністю спричиняє виникнення міалгій шляхом зниження активності макроергічних сполук у м'язі, що пригнічує скоротливу здатність актин-міозинового комплексу.

Ключові слова: актин-міозинового комплекс, інтерферон альфа, ішемія-реперфузія, м'язи, міокард, АТФ-азна активність, креатин фосфат, ізольоване серце, коронарна перфузія.

Умови одержання звіту: за договором, УкрІНТЕІ, вул. Антоновича, 180, м. Київ, 03680.

ANNOTATION

Research Object - the activity of the actin-myosin complex in muscles under the influence of interferons with varying biological activity.

Purpose of the Study - to investigate the effect of recombinant interferons with different biological activities on the actin-myosin complex of muscles.

Research Methods - colorimetric and biochemical methods were employed to assess the influence of interferons on the function of the actin-myosin complex. The data obtained were analyzed using non-parametric statistical methods, with the use of the Mann-Whitney criterion.

The study examined the non-immunological impact of recombinant interferon preparations. Specifically, it was the first time that the ATPase activity of the actin-myosin complex and the content of creatine phosphate in muscles under the influence of the immunobiological preparation were determined. It was also demonstrated for the first time that high concentrations of recombinant interferons lead to a reduction in the quantity of macro-energetic compounds in muscles. A regularity was established that explains the side effects of interferon preparations, especially when used in high therapeutic doses. Thus, it was first determined that the administration of interferons with high biological activity induces myalgia by reducing the activity of macro-energetic compounds in muscles, which suppresses the contractile ability of the actin-myosin complex.

Keywords: actin-myosin complex, interferon alpha, ischemia-reperfusion, muscles, myocardium, ATPase activity, creatine phosphate, isolated heart, coronary perfusion.

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. Огляд літературних джерел.....	9
1.1. Будова поперечносмугастих м'язових волокон.....	9
1.1.1. Молекулярні механізми м'язового скорочення.....	11
1.1.2. Актинові (тонкі) і міозинові (товсті) філаменти.....	14
1.1.3. АТФ-азна активність актин-міозинового комплексу.....	18
1.2. Роль інтерферонів в організмі.....	19
1.2.1. Загальна характеристика інтерферонів.....	21
РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи дослідження.....	28
2.1. Матеріали та умови проведення дослідів.....	28
2.2. Дослідження актин-міозинового комплексу м'язів в умовах дії інтерферонів різного походження.....	28
2.3. Методика дослідження дії препарату на ізольованому м'язі.....	29
2.4. Кількісне визначення вмісту аденозинтрифосфату та креатинфосфату в м'язах.....	30
2.5. Дослідження впливу інтерферону на ізольоване серце.....	32
РОЗДІЛ 3. Аналіз та обговорення отриманих результатів.....	34
3.1. Вміст макроергічних сполук в м'язах за умов уведення плацебо.....	34
3.2. Рівень аденозинтрифосфату та креатинфосфату в м'язах під впливом рекомбінантного інтерферону α -2b з питомою активністю 1 000 000 МО.....	36
3.3. Кількісний вміст макроергічних сполук в м'язах під час дії рекомбінантного інтерферону α -2b з питомою активністю 3000000 МО.....	38
3.4. Дія інтерферону на серцевий м'яз.....	42
ВИСНОВКИ.....	51
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	53

ВСТУП

Інтерферонами можна назвати групу аутогенних глікопротеїнів, їхній механізм впливу повинен бути пов'язаний з одночасним антивірусним ефектом, через шлях активації клітинних генів, котрі відповідальні за процес синтезу білків-інгібіторів реплікації вірусних нуклеїнових матеріалів [3]. Ці активні сполуки володіють здатністю посилено збільшувати вираження антигенів головного комплексу гістосумісності на поверхні біологічних мембран, вони покращують активність важливих цитотоксичних Т-клітин та, відповідно, природних кілерів [4; 6].

Інтерферони можна розділити на два головних типи. Інтерферони «першого типу» можуть виступати як інгібітори повторного відтворення вірусу й відповідно забезпечують стабільний противірусний ефект. До цього типу ми відносимо 22 різних підкласи інтерферону-альфа та один підклас інтерферону-бета. До іншого типу, який має властивості імунomodulatory активності, відповідно належать інтерферон-гамма. Для фармакологічної практики для терапії вірус-залежних захворювань та онко-новоутворень найбільшого використання має біотехнологічний рекомбінантний засіб людського інтерферону альфа [4].

Інтерферон - складний препарат, який викликає величезну кількість побічних ефектів. Нещодавно з'явилася значна частина публікацій яка стосується плейотропних впливів рекомбінантного інтерферону альфа. Основне місце посідають сторонні ефекти з боку опорно-рухового апарату. Дія препарату на організм вивчена в малій мірі, досі не визначенні оптимальні дози інтерферону при певних видах захворювань. Особливо цей аспект актуальний при використанні інтерферону з великою питомою активністю.

Мета і задачі дослідження. Мета роботи полягала у вивченні дії рекомбінантних інтерферонів з різною біологічною активністю на актин-міозинний комплекс м'язів.

Для досягнення мети були поставлені та вирішені наступні завдання дослідження:

1) розглянути плейотропні ефекти після уведення екзогенних рекомбінантних інтерферонів;

2) провести дослідження вмісту макроергічних сполук у м'язах за умов уведення плацебо;

3) дослідити рівень аденозинтрифосфату та креатинфосфату в м'язах під впливом рекомбінантного інтерферону α -2b з питомою активністю 1 000 000 МО;

4) визначити вміст макроергічних сполук у м'язах під час дії рекомбінантного інтерферону α -2b з питомою активністю 3 000 000 МО.

5) з'ясувати вплив рекомбінантного інтерферону на серцевий м'яз.

Об'єкт дослідження – активність актин-міозинового комплексу м'язів в умовах дії інтерферонів з різною біологічною активністю.

Предмет дослідження – АТФ-азна активність актин-міозинового комплексу та вміст креатинфосфату в м'язах під впливом рекомбінантних препаратів інтерферону альфа.

Методи дослідження. Для оцінки впливу інтерферонів на функціонування актин-міозинового комплексу було застосовано колориметричні та біохімічні методи. Отримані дані аналізувалися за допомогою методу непараметричної статистики, з використанням критерію Мана-Уїтні.

Наукова новизна одержаних результатів. У роботі було досліджено не імунологічний вплив рекомбінантних препаратів інтерферону. Зокрема, вперше було визначено АТФ-азну активність актин-міозинового комплексу та вміст креатинфосфату в м'язах під впливом імунобіологічного препарату. Вперше показано, що під дією високих концентрацій рекомбінантних інтерферонів відбувається зниження кількості макроергічних сполук у м'язах. Встановлена закономірність, що пояснює побічні ефекти дії препаратів інтерферонів, особливо під час застосування високих

терапевтичних доз. Таким чином, вперше встановлено, що введення інтерферонів з високою біологічною активністю спричиняє виникнення міалгій шляхом зниження активності макроергічних сполук у м'язі, що пригнічує скоротливу здатність актин-міозинового комплексу.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати можуть бути використані для корекції високих доз препаратів рекомбінантного інтерферону, які застосовуються для лікування як вірусних, так і злоякісних захворювань. Особливо це стосується дітей, які є більш чутливими до побічних ефектів, що спостерігаються під час інтерферонотерапії. Отримані результати дослідження можна застосовувати під час викладання курсів “Імунологія” та “Фізіологія людини і тварин”.

Апробація результатів дослідження. Результати досліджень обговорювалися під час виступу на науковому семінарі кафедри біології людини та імунології Херсонського державного університету.

Робота складається із вступу, трьох розділів, висновків, списку використаних джерел, ілюстрована 13 рисунками та 4 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1.1. Будова поперечносмугастих м'язових волокон

Поперечносмугасті (скелетні) м'язи хребетних тварин складаються з м'язових волокон. Кожне м'язове волокно - це багатоядерна клітина циліндричної форми, діаметром від 20 до 80 мкм, довжиною - від декількох міліметрів до десятків сантиметрів, відповідно до довжини м'яза. В м'язах волокна об'єднані в пучки по 20 - 40 волокон, які відділені один від одного за допомогою тонкої оболонки зі сполучної тканини, що складається з колагенових і еластинових волокон. Безпосередньо до цієї оболонки з боку м'язового волокна прилягає плазматична мембрана - сарколема. Внутрішня частина м'язового волокна складається із ультраструктур клітини і саркоплазми, яка містить водорозчинні білки і низькомолекулярні сполуки [17; 20].

Кожне волокно містить близько 2000 міофібрил діаметром 1 - 2 мкм, які тягнуться з одного кінця волокна до іншого. Міофібрила - це спеціалізована функціональна ультраструктура поперечносмугастих м'язових волокон. Характерною особливістю будови міофібрил є поперечна смугастість, яку можна побачити за допомогою оптичного і, особливо, електронного мікроскопу. Вона зумовлена високою упорядкованістю розміщення товстих і тонких протофібрил у кожній міофібрилі (Рис. 1.1).

Кожна міофібрила поділена за допомогою Z - дисків на безліч структур, що повторюються і які мають назву саркомери. Довжина саркомера становить 2 - 3 мкм. Міофібрили розміщені в м'язовому волокні таким чином, що їх Z-диски знаходяться на одному рівні. Товсті і тонкі протофібрили утворюють в центрі саркомера анізотропну А-смужку шириною 1,6 мкм [17; 22; 33].

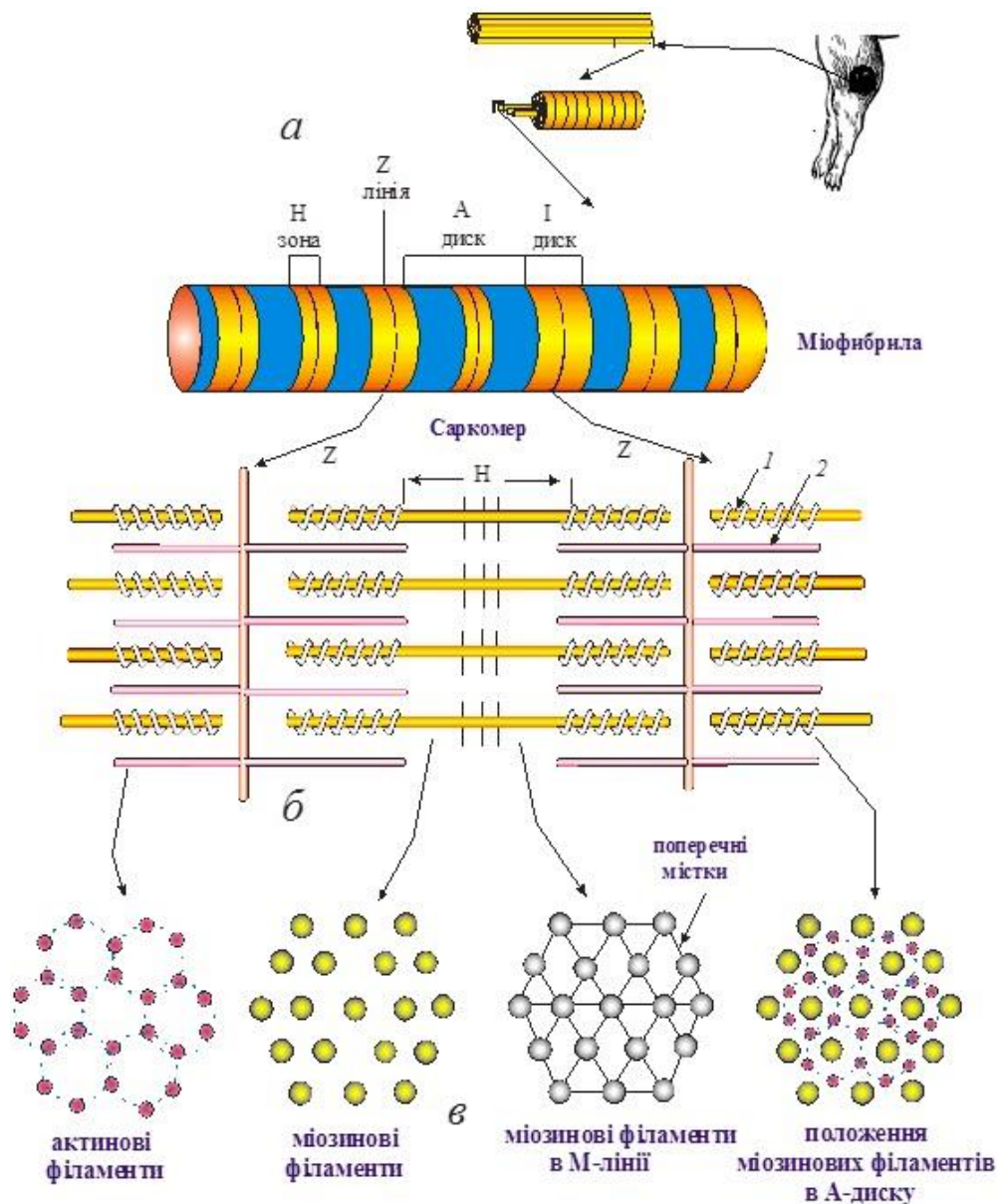


Рис. 1.1. Будова м'язового волокна і саркомера скелетного м'яза

Примітка: *a* - основні структурні елементи м'язового волокна; *б* - повздовжнє розміщення товстих і тонких протофібрил в саркомері; *в* - поперечний розріз саркомера в різних ділянках 1 - товста протофібрила, 2 - тонка протофібрила.

Тонкі протофібрили з'єднані з Z-дисками і розміщуються симетрично по обидва боки Z-дисків і утворюють ізотропну I-смужку. Посередині A-смужки є H-зона. Особливість H-зони полягає і тому, що в цій ділянці саркомеру товсті протофібрили не містять голівок міозину. Посередині H зони знаходиться M-смужка, шириною 0,1 мкм [17; 23].

Кожна структурно-функціональна мікросубодиниця фазного

м'язового волокна - саркомер - оточена сіткою СР, який складає 10 - 15% об'єму волокна. Площа мембрани СР приблизно в 100 разів більша, ніж площа плазматичної мембрани. В порожнинах СР містяться ті ж іони, що і в міоплазмі, - K^+ , Na^+ , Cl^- і Ca^{2+} , і його мембрана добре проникла для цих іонів [17; 18; 22].

В кожному саркомері ретикулум містить термінальні цистерни, що охоплюють міофібрили у вигляді майже суцільних манжет з обох боків від Z-диску, і повздовжні канали, які посередині А-смужки зливаються в плоску цистерну, що охоплює міофібрили з усіх боків. Ця структура має назву продірявленого комірця, або обруча, оскільки для неї характерні невеликі круглі отвори. СР двох сусідніх саркомерів одної міофібрили ізольовані один від одного Z -диском. Інколи ця ізоляція порушується анастомозами між сусідніми цистернами. Всі елементи СР і Т-трубочки є спільними для сусідніх паралельно розміщених міофібрил даного саркомеру. СР містить, виділяє і реакумулює іони Ca^{2+} , які відіграють основну роль в активації скорочення.

Через мембрану термінальних цистерн іони Ca^{2+} виходять із ретикулуму в міоплазму, тоді як через мембрану повздовжніх трубочок відбувається активний транспорт іонів Ca^{2+} назад до ретикулуму [33; 34].

1.1.1. Молекулярні механізми м'язового скорочення. Міозин - один із головних білків м'язових волокон (Рис. 1.2), який складається з шести поліпептидних ланцюгів: двох важких і чотирьох легких. Протеолітичні ферменти (трипсин і папаїн) розщеплюють міозин на фрагменти: легкий мероміозин (ЛММ), важкий мероміозин (ВММ), субфрагмент 2 (С2) і два субфрагменти 1 (С1). Заслужують на увагу такі фізико-хімічні характеристики міозину та його фрагментів: міозин – $M = 480$ кДа, довжина 160 нм; ВММ – маса (M) = 340 кДа, довжина 60 нм; ЛММ - $M = 140$ кДа, довжина 80 нм; С2 – $M = 62$ кДа, довжина 47,5 нм; С1 (голівка міозину) – $M = 120$ кДа, довжина 19 нм, товщина 6 нм [41, с. 98].

Окремі фрагменти міозину виконують певні фізіологічні функції. Так, ЛММ має важливе значення для утворення протофібрил. В субфрагменті С1 (голівці міозину) локалізовані АТФазні центри і центри зв'язування з актином. Голівки міозину виконують роль поперечних містків і створюють активну тягнучу силу в саркомері під час скорочення м'яза [3; 7].

Молекула міозину при обробці сечовиною або хлоридом гуанідину дисоціює на два важкі ланцюги з $M = 200$ кДа і чотири легкі ланцюги: g_1 , $2g_2$ і g_3 . Два однакові g_2 -ланцюги ($M = 18,5$ кДа) відщеплюються при обробці міозину 5,5-дітіобіс-2-нітробензойною кислотою (ДТНБ). Тому їх називають ще ДТНБ-легкими ланцюгами (Рис. 1.2). Два інших легких ланцюги g_1 ($M = 20,7$ кДа) і g_3 ($M = 16,5$ кДа) дисоціюють у лужному середовищі ($pH = 11$) і тому їх називають лужними легкими ланцюгами. ДТНБ-легкі ланцюги локалізовані поблизу "шарнірного" сполучення С1 - С2 (Рис. 1.2).

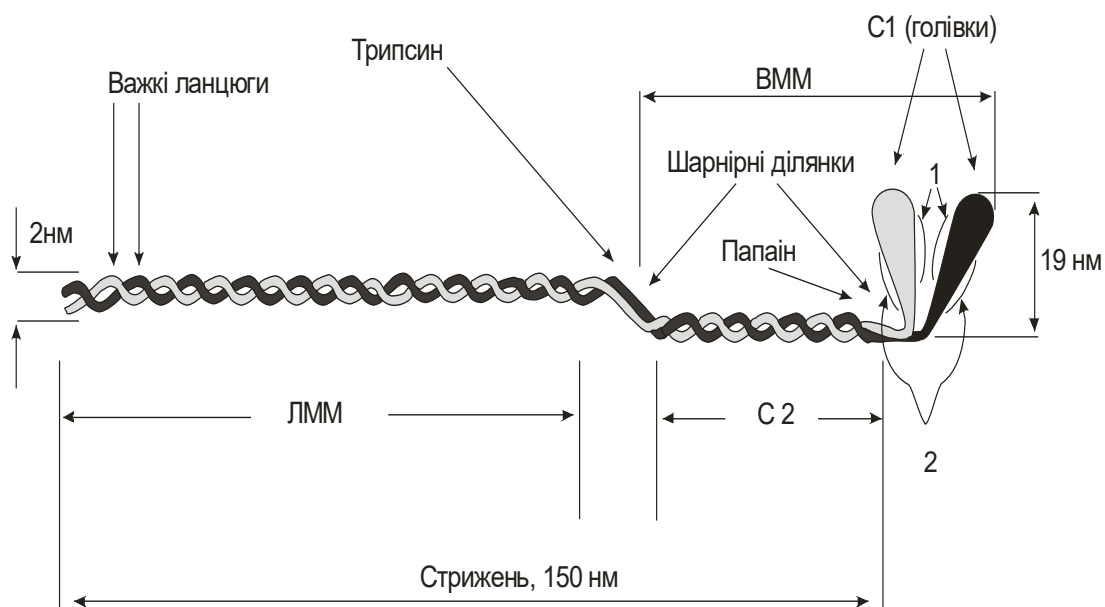


Рис. 1.2. Структурна схема молекули міозину поперечносмугастого м'яза

Для виконання механічної роботи м'язом використовується енергія, що звільняється при гідролітичному розщепленні АТФ в активних центрах міозину. Тому АТФ-азна активність міозину є головною його функціональною характеристикою. Міозинова АТФ-азна реакція не підпорядковується простій кінетиці Міхаелеса - Ментен, а проходить через ряд стадій, під час яких утворюються проміжні (інтермедіатні) конформації міозину M^* і M^{**} , збагачені енергією (Рис. 1.3) [34, с. 250].

Початкові стадії - приєднання АТФ до міозину ($k_2 = 400 \text{ c}^{-1}$) і розщеплення АТФ з утворенням найбільш збагаченого енергією інтермедіата M^{**ADP} ($k_3 = 160 \text{ c}^{-1}$) - досить швидкі. При відсутності актину стадія, пов'язана з переходом M^{**ADP} в низькоенергетичну форму M^*ADP , є найбільш повільною ($k_4 = 0,04 \text{ c}^{-1}$), а отже і швидкість – лімітуючою стадію АТФазної реакції міозину [19].



Рис. 1.3. Гідроліз АТФ актоміозиною системою

Примітка: АМ - актоміозин, М - міозин, А - актин, M^* , M^{**} - інтермедіатні конформації міозину, збагачені енергією.

При взаємодії актоміозину (АМ) з АТФ утворюється інтермедіат $AM^* \cdot ATP$, після чого актин дуже швидко дисоціює. За відсутності актину відбувається перетворення $M^* \cdot ATP \Leftrightarrow M^{**} \cdot ADP$. Потім актин швидко асоціюється з M^{**ADP} і значно прискорює розпад цього комплексу. В присутності актину стадія $AM^{**ADP} \Leftrightarrow AM^*ADP$ прискорюється на декілька

порядків ($K_5 = 20 \text{ c}^{-1}$) у порівнянні з перетворенням $M_{\phi}^{**ADP} \Leftrightarrow M_{\phi}^{*ADP}$ [19; 34].

Отже, характерною особливістю розглянутого механізму є дисоціація і рекомбінація актоміозинового комплексу для кожного оберту АТФазного циклу. Поведінка простої актоміозинової моделі збігається з кінетичною моделлю скорочення м'яза, в якій передбачається утворення і зникнення поперечних містків між актиновими і міозиновими протофібрилами під час механохімічного циклу.

Енергія, що виділяється при гідролізі АТФ, запасується в інтермедіаті M_{ϕ}^{**ADP} у формі конформаційної перебудови голівки міозину. Актин діє як акцептор цієї енергії, завдяки чому прискорюється АТФазна реакція і збільшується швидкість дисоціації продуктів реакції.

1.1.2. Актинові (тонкі) і міозинові (товсті) філаменти. Дані електронної мікроскопії і дифракції рентгенівських променів стали визначальними для уявлення про міофібрили як про високовпорядковані скоротливі ультраструктури з точним розміщенням двох типів філаментів або протофібрил. В м'язовому волокні філаменти зберігають активний стан і виконують скоротливу функцію при фізіологічних значеннях іонної сили (0,1 - 0,15). Зниження або підвищення іонної сили розчину порушує структурну організацію філаментів. Це явище використовується для вибіркового виділення скоротливих білків із міофібрил. Розчини з низькою іонною силою (менше 0,05) призводять до розпаду тонких філаментів на окремі білки (актин, тропоміозин, тропонін, актинін). При екстракції розчинами високої іонної сили (більше 0,25) відбувається дисоціація товстого філаменту і виділяється міозин і ряд мінорних білків товстого філаменту.

Кожний саркомер складається із товстих міозинових (довжиною 1,6 мкм і діаметром $\sim 18 \text{ нм}$) і тонких актинових (довжиною 1 мкм і діаметром $\sim 10 \text{ нм}$) філаментів, що частково перекриваються. В ділянках перекриття в поперечному розрізі філаменти утворюють гексагональну структуру (Рис.

1.2, в).

Взаємодія між товстими і тонкими філаментами здійснюється за допомогою голівок молекул міозину або так званих поперечних містків, які виступають із міозинових філаментів. Товсті філаменти знаходяться в А - смужці саркомера, тонкі – в І-смужці і частково в А - смужці. Вільна від тонких протофібрил центральна частина саркомера позначається Н-смужкою. В центрі А-смужки знаходиться М-смужка. Поблизу Z-диска є дві N-смужки. Вони розміщуються на відстані 0,1 мкм (N₁-полоса) і 0,3 мкм (N₂-полоса) від Z-диска [17; 41].

За допомогою електронної мікроскопії показано, що скорочення м'яза супроводжується зменшенням довжини І- та Н- смужок без зміни довжини А-смужки. Зміна довжини І- та Н- смужки зумовлені відносним зміщенням товстих і тонких філаментів при м'язовому скороченні.

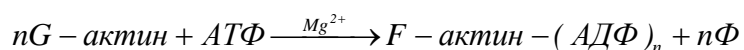
Основним білком тонкої протофібрили є фібрилярний актин, або F-актин. Дифракційна картина тонкої протофібрили дає характерний рефлекс 5,5 нм, пов'язаний з розсіянням рентгенівських променів на окремих глобулах G-актину. Мономерні глобули G-актину вивчають у розчинах з низькою іонною силою (меншою 0,1). Діаметр таких глобул 5,5-6,0 нм. В даний час повністю встановлена первинна структура G-актину, який складається із 374 амінокислотних залишків. Молекулярна вага G-актину дорівнює 42 кДа.

Довгий час вважалось, що актин є найбільш консервативною структурою, яка постійна для різноманітних в еволюційному плані рухомих систем. Детальний порівняльний аналіз актинових молекул м'язових і нем'язових клітин виявив невелику різницю в амінокислотному складі, в N-кінцевій частині молекули. Із нем'язових клітин і ембріональної м'язової тканини виділяються β- і γ-актин. В гладеньких м'язах представлений γ - актин.

Властивість мономерного глобулярного актину полімеризуватися з утворенням спіральних філаментів (F-актину) має важливе біологічне

значення у всіх еукаріотичних клітинах. Тривимірну структуру актинового мономера встановлено за допомогою електронної мікроскопії та рентгеноструктурного аналізу [3;7].

Актин складається з двох доменів, які, не зважаючи на близькі розміри, названі великим та малим. У щілині між ними знаходиться нуклеотид (АТФ або АДФ) та іон кальцію або магнію, N- і С- кінці знаходяться в малому домені. Кожен домен складається із двох субдоменів. При підвищенні концентрації солі мономерний актин полімеризується з утворенням F-актину. Мономерний актин зв'язує одну молекулу АТФ, яка гідролізується до АДФ при полімеризації.



Утворення актинового філаменту відбувається в обох напрямках (з обох кінців), але з різною швидкістю. F - актин - це спіраль, на шість обертів якої (~36 нм) припадає 13 глобул актину. Оскільки оберт на одну глобулу актину становить 166° , то актиновий філамент можна описати як ліву одноланцюгову генетичну спіраль, крок якої - 5,9 нм, або як дволанцюгову праву спіраль, крок якої - 72 нм. У структурі філаменту глобули актину можуть обертатися на кут до 10° [19; 34].

Крім актину тонка протофібрила містить фібрилярний білок тропоміозин, ТМ (М = 68 кДа) і глобулярний білок тропонін, ТН (70 кДа). Особливість будови актинового філаменту полягає в тому, що подвійну спіраль глобул актину обвивають ще дві нитки, утворені з тропоміозину (ТМ), надвторинна структура якого являє собою подвійну α -спіраль (суперспіраль). Молекули ТМ зв'язані між собою по принципу «хвіст – голова». З тропоміозином зв'язаний тропоніновий комплекс через найбільш витягнуту субодиницю тропоніну – тропонін Т. Цей комплекс повторюється з двох боків вздовж актинового філаменту з інтервалом 40 нм. Зараз висловлюється думка, що актин може мати далекодійну кооперативність, що поширюється через субодиничні зв'язки по всьому філаменту і що це може мати фізіологічне значення, тобто актиновий

філамент може відігравати більш динамічну, більш активну роль в м'язових клітинах, ніж вважалось.

Крім названих, до складу тонкої протофібрили входять також інші білки. На незакріплених частинах актинового філаменту по середині частини саркомера знаходиться β -актинін. Він впливаючи на процес полімеризації актину. Із Z -диску виділені α -актинін (масою 180 кДа), філамінін (масою 240 кДа), десмін (масою 50 кДа). Філамін і α -актинін виявлені всередині Z-дисків. Ці білкові сполуки формують своєрідні містки між актиновими ниткоподібними філаментами, формуючи з них пучки і приєднують їх до Z-диску. Десмін розташовується на периферії Z-дисків та в місцях, де Z-диски з'єднуються з сарколемою [34; 37; 41].

Міозин присутній у всіх еукаріотичних клітинах, особливо в скелетних м'язах, де він формує впорядковані структури. Це білковий мотор, який перетворює хімічну енергію гідролізу АТФ в механічну роботу при м'язовому скороченні, русі органел і других внутріклітинних процесах, пов'язаних з переміщенням певних структур. Крім того, міозин здатний до самоасоціації, утворюючи філаментні агрегати, які називаються міозиновими, або товстими філаментами. На початку агрегація міозину відбувається по принципу «хвіст до хвоста» і далі «хвіст до голови» [41, с. 255].

Характерною особливістю хвостової частини молекули міозину є чергування позитивних і негативних зарядів кратно 28 амінокислотним залишкам. Ця періодичність розподілу зарядів забезпечує правильну упаковку міозинового філаменту за рахунок електростатичного притягання між паралельно розміщеними міозиновими молекулами.

Товсті філаменти, які складаються, головним чином, із молекул міозину, мають витягнуту циліндричну структуру довжиною 1,6 мкм і діаметром 18 нм. В центральній частині філаменту (довжиною 160 - 180 нм) відсутні поперечні містки, в результаті чого утворюється «гола зона» філаменту (Рис. 1.2), в якій міозинові молекули з'єднані «хвостом до

хвоста». Далі в обидва кінці від центру філаменту молекули міозину агрегують полярно за типом «хвіст до голівки». Міозинові голівки виступають на поверхні у вигляді поперечних містків формуючи кроки спіралі 42,9 нм і субодичним періодом 14,3 нм. Встановлено, що голівки молекул міозину в товстому філаменті утворюють трьохвиткову спіраль. В товстій протофібрилі виявлені також мінорні білки, С-, Х-, Н- і І-білки з молекулярною масою відповідно 140, 133, 64 і 50 кДа [41, с. 256].

На сьогодні існує декілька моделей міозинового філаменту. Спільним для більшості з них є те, що в них субфрагмент-2 молекули міозину не входить до стовбура міозинового філаменту. Це пов'язано з тим, що в перших моделях м'язового скорочення С2 виконувала активну роль (переміщення від і до міозинового філаменту, як важеля при м'язовому скороченні). Але при такому принципі упаковки значна частина об'єму філаменту не буде заповнена молекулами міозину, тобто, тільки ЛММ не здатний утворити міозиновий філамент відповідних розмірів.

1.1.3 АТФ-азна активність актин-міозинового комплексу

АТФ є сполукою, яка містить макроергічні зв'язки, тобто мають велику кількість енергії (Рис. 1.4). Необхідно відзначити поняття «багатий енергією зв'язок» яке у біохімії відмінне від поняття «енергія зв'язку» у хімії. Загалом, під макроергічними сполуками розуміють енергію, яка являє собою необхідну для розриву зв'язку поміж двома атомами всередині молекули (для розриву путніх енергетичних зв'язків також варто затратити енергію). Вивчаючи в біохімії потужньоенергетичні та слабкоенергетичні зв'язки і сполуки, енергію зв'язування зв'язку іменують як вільну енергію, що продукується при гідролітичному руйнуванні даної сполуки [9; 14].

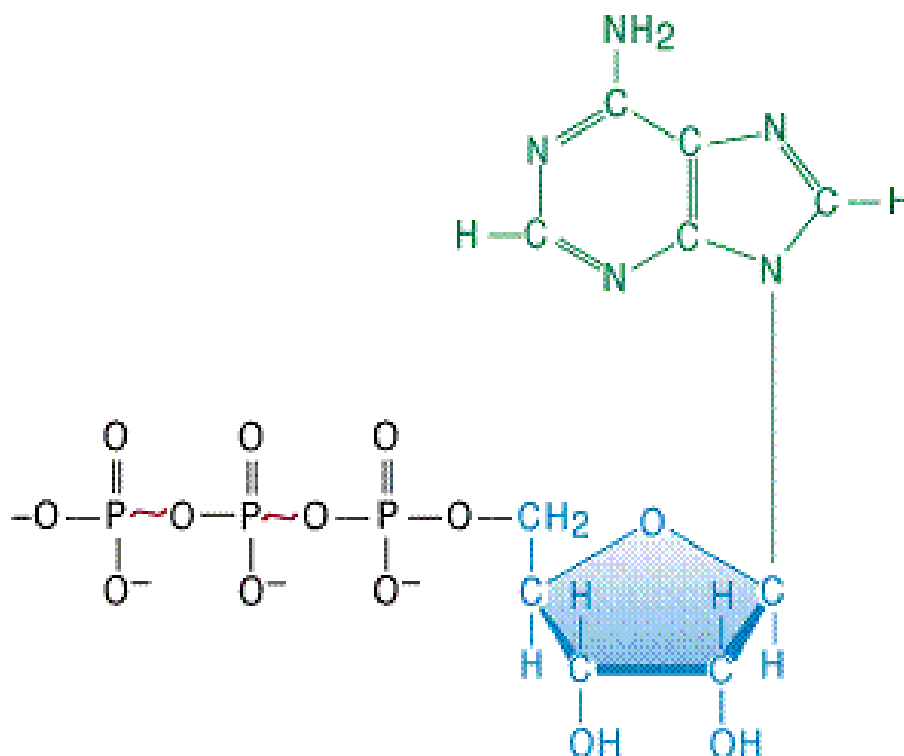


Рис. 1.4. Хімічна формула АТФ

Енергія здатна до акумулювання в довільних субстратах окиснення, окрім цього лише енергія у формі АТФ здатна використовуватися клітинами організму. Через це АТФ можна іменувати «універсальним похідним джерелом енергії» [3; 7].

1.2. Роль інтерферонів в організмі

Інтерферони - спеціалізовані противірусні білки, що здатні експресуватися зараженими клітинами а й навіть цілим організмом. Відкриття цієї сполуки відбулося англійськими вірусологами Айзексом і Лінденманом (1957). Зазначеному відкриттю передувала значна кількість робіт з інтерференції яка спостерігалася серед заражених клітин. Власне, після досліджень та спостережень за цим цікавим феноменом і народилася ідея знайти специфічний антивірусний білок [16; 27; 31].

Зараз відомо не лише один інтерферон, а також інтерферони, точніше не один білок, а цілий клас білків, що здатні розрізнятися за різною

молекулярною масою та іншими додатковими параметрами. У клітинах людини виявили 27 генетичних локуса відповідних до інтерферонів, з яких 14 вважаються функціонуючими. Інтерферони передусім заковані в генетичному апараті будь-якої клітини [25; 42].

Наразі система інтерферону позбавлена центрального органу через те, що здатністю виробляти ці активні сполуки володіють усі клітини теплокровних хребетних, дуже найбільш активно виробляють цю сполуку клітини лейкоцити. Інтерферон самовільно не продукується інтактними клітинами, проте для утворення його існує потреба в індукторах, до яких належать віруси, отруйні бактеріальні токсини, рикетсії, різноманітні екстракти з бактерій й грибів, різноманітні фітогемаглютиніни, складні синтетичні речовини – або полікарбоксихли, та полісульфати, декстрини, проте найбільш потужними індукторами цих інтерферонів є двоспіральні РНК, а також убиті і живі віруси.

Генетична інформація яка є необхідною для продукції інтерферону перебуває в ДНК клітини, та для його формування в клітині спочатку повинен бути попередній синтез інформаційної РНК заснований матриці клітинної ДНК на ранньому початкові після зараження. Реплікація інформаційної рибонуклеїнової кислоти для інтерферонів попередньо каталізує внутрішньоклітинна РНК-полімераза [16; 31].

Сумарна кількість інтерферону в клітині формується після індукції спочатку. Фактично всі клітини певною мірою здатні утворювати інтерферон, проте не клітини лінії Vero. Необхідний період часу між початковою інтеракцією індуктора і клітини (так звана адсорбція індуктора) і синтезом інтерферону, належить до період lag-період, та залежить від сили системи індуктор - клітина. Під час використання як індуктору вірусної нагртки lag-період у переважній більшості триває 4 — 8 годин [25; 28].

За деяких вірусних суперінфекціях інтерферон продукується в величезних кількостях у тканинах, уражених видолспецифічним вірусом. За ступенем впливу інтерферони діляться на дві групи: I тип — «класичний»,

другий тип – імунний, або нестійкий до кислоти [39].

Інтерферон призводить до збільшенню кілерної активності сенсibiliзованих (активованих) Т-лімфоцитів, або стимулює функцію в клітин, але стосовно до впливу інтерферону нею не досліджували [42, с. 356].

Людський організм активується після вторгнення вірусу масивним утворенням інтерферону в клітинах зараженої тканини та тим самим зашкоджує реплікації вірусу, зменшує його дію. Головний фактор, що визначають відповідну стійкість організму, і є його відповідна здатність цих тканин продукувати інтерферон. Різні тварини мають неоднакову її здатність і визначається певними вродженими особливостями організму та відповідно віком.

Продукування інтерферону ураженими тканинами організму залежать і від зовнішніх умов, наприклад погода, оточуюча температура; узимку та навесні організм виробляє меншу кількість інтерферону, у порівнянні із теплим періодом року. Саме тому влітку населення значно рідше заражаються вірусними інфекціями.

Вплив вікових особливостей в становленні продукції інтерферону також має місце. Існують обумовлені віком закономірності синтезу білків інтерферону у людини. Проведені дослідження вказують на те, що, в процесі росту живий організм містить певну кількість пригнічувачів інтерфероутворення в сироватці крові зменшується проте кількість різноманітних факторів, що здійснюють активацію цього процесу, зростає [25; 27; 42].

1.2.1. Загальна характеристика інтерферонів. Біологічноактивні інтерферони (ІФН) – належать до групи аутогенних білків, біологічний механізм впливу яких пов'язаний з потужним противірусним ефектом – сильною активацією генів уражених клітин, в результаті чого відбувається

синтез білків, які порушують синтез вірусної ДНК (або й РНК) та здатні спричиняти імуномодуючий ефект - вміють посилювати гіперекспресію антигенів HLA на поверхні мембран клітин та посилювати активність гіпеактивованих цитотоксичних Т-лімфоцитів і відповідно, натуральних кілерів [4].

Інтерферони є протеїнами, що здатні неспецифічно боротися з вірусною інфекцією, щонайменше, у клітинах одного й того виду теплокровних тварин, з якого ці сполуки було отримано, і впливаючи на певний клітинний метаболізм, зокрема синтез РНК та білкових молекул [15].

Більше шести десяти років тому, в 1957 році, науковці відкрили настільки знаменитий та затребуваний нині інтерферон. Цей білок (точніше сказати, глікопротеїн) виявився ключиком, який відкрив людству багато дверей. Цей біологічно активний протеїн пролив світло на процеси та закономірності виникнення й розвитку інфекційних процесів. Цей білок став помічником у боротьбі з вірусними інфекціями. Інтерферон у великих дозах дозволив контролювати ріст пухлин.

Відкриття явища що спричинило відкриття вірусів було обумовлено тим, що Жан Лінденманн планував займатися вирощуванням та дослідженням поліовірусів на культурі ниркових клітин отриманих від кроля. (У науковців це сімейства вважалося найбільш перспективним напрямком для вивчення вірусів ссавців.) Проте, поліовіруси не продукувалися на цьому субстраті та була потреба у зміні експериментів та середовища. Після знайомства з іншим науковцем - Аліком Айзексом, який був випущився з Единбурзького університету. Вчений Лінденманн подружився з Айзексом та разом вони змогли відкрити явище інтерференції [16; 27; 31].

Явище інтерференції дуже поширене, при цьому зустрічається воно не лише в живій природі. Сутність інтерференції є в тому, що субстанція або організм під час взаємодії з собі подібним призводить до пригнічення

його, або ж він послаблюється самостійно. В екології зазначений термін позначає підвид конкуренції, що спричиняє утиск одного виду мікро- чи макроорганізмів іншим, при цьому ці види є близькими філогенетично [25, с. 256].

У середині минулого століття термін «інтерференція» прижився і його досі використовують для позначення явища конкурентної взаємодії вірусів. Спочатку дослідники помітили, а потім і довели статистично, що під час процесу зараження клітини певним одним типом вірусу спроби зараження іншим не є вдалими. Виходить так, що у вже окупованій клітині новому «інтервенту» вірусу робити вже нічого. Цілком логічно, що цей феномен зацікавив дослідників. Науковці вирішили використати це явище задля розробки методу профілактики та лікування небезпечних вірусних інфекцій.

Айзекс і Лінденманн, які були співробітниками Національного інституту медичних досліджень (National Institute for Medical Research), провели значну роботу з метою пояснення феномену інтерференції вірусів [16].

Використання лабораторної моделі, яка була запропонована шотландсько-швейцарським науковим дуетом, була проста і елегантна. Вони використовували інактивованій вірус (який спричиняв грип) вводили в оболонку ембріона курки, тим самим провокуючи тим самим стимулюючи утворення спеціальної речовини, яку вони потім й назвали інтерфероном. Науковці лише здогадувалися про існування цієї сполуки, саме тому охрестили її «флюїдом». Використання отриманого «флюїду» та його уведення у свіжу, попередньо не інфіковану оболонку, проте в подальшому намагання заразити ембріон вірусом грипу (потужним, неослабленим) не дала ніких результатів. Досліджувані ембріони ставали невразливими до дії вірусів. Відповідно, цим «флюїдом» був майбутній препарат інтерферон.

Науковець Лінденманн пізніше у своїх спогадах зізнається, що вони досліджувану сполуку на лабораторному сленгу назвали інтерфероном, при

цьому це робоча назва й закріпилася за цим «флюїдом» остаточно у фармакологічній практиці. Цікавим є те, що для проведення цих досліджень науковцям знадобилося менше року.

Використання інтерферону призводило до того, що всі відомі віруси переставали реплікуватися під впливом нової сполуки - інтерферону. Цей «універсальний солдат» дуже сильно відрізнявся від дотепер відомих хіміопрепаратів своєю значною багатофункціональністю. При цьому, віруси, як відомо, не чутливі до застосування антибіотиків. Таким чином, ця сполука, потрапивши до рук фармацевтів, змогла стати першим препаратом, який можна використовувати при лікуванні вірусних інфекцій. Оскільки віруси є унікальною формою життя що не знищується іншими мікроорганізмами [27; 31].

Ці дослідження призвели до того, що у середині 60-х років минулого століття почали використовувати перше покоління інтерферонів з лікувальною метою. Науковим світом це було сприйнято як подарунок людству, оскільки з'явилася можливість лікувати велику кількість хвороб до того невиліковних.

Після того як вони відкрили та змогли продемонструвати успішне застосування нового препарату інтерферону в якості антивірусного сильнодіючого препарату, вчені змогли відкрити ще одну його властивість – стримувати ріст ракових клітин. Дослідник Іон Грессер продемонстрував, що цей біологічно активний білок здатний додатково і на подекуди інші, куди великі чудеса: у лабораторних мишей він зміг зупинити проліферацію онкоклетин.

Потужний прорив у новій галузі вірусології та хіміотерапевтичної онкології надихнув додатково іншого вченого – уродженця Фінляндії Карі Кантеллі. Він наважився проводити експерименти з подальшого отримання людського інтерферону з суспензії лейкоцитів людської крові, які культивують у пробірці. Можна сказати, що ці дослідження дозволили надати цьому білку шлях у подальший світ біотехнологій [16; 31].

Після цього інтерферон науковці виявили інтерферон у всіх хребетних. Не зважаючи на те, що його амінокислотна послідовність є видоспецифічною (у різних видів живих організмів різна), молекула інтерферону проявляє важливу антивірусну активність навіть за умов використання у клітинах іншого виду. Проте білок-інтерферон, який, наприклад, продукують клітини кролика, є набагато менш ефективним так і корисним у боротьбі з викликаною інфекцією, якщо порівнювати його вплив із «рідним», людським.

Ця особливість білкової молекули дозволила чітко сформулювати одне з найважливіших завдань, які з'явилися перед біотехнологами: «отримання» інтерферону з людських донорських лейкоцитів був відповідно занадто дорогим, проте використання крові тварин не давало змоги отримати настільки ж успішні результати. Коли пройде певний проміжок часу поставлена задача буде вирішена. Наприкінці семи десятих років двадцятого століття будуть розшифровані усі гени людського інтерферону. Проте до того часу доводилося добувати інтерферон лише шляхом стимуляції донорських лейкоцитів з донорської крові [15; 28].

Таким чином, інтерферони мають властивості плейотропних цитокінів, при цьому вони володіють антивірусною активністю, завдяки антипроліферативній, антипухлинній та імуномодуляторній активності вони мають перспективний напрямок застосування для фармакотерапії значного спектру вірусних інфекцій. Певна особливість інтерферону не дозволяє його широко використовувати у ветеринарії оскільки він проявляє свою активність тільки в організмах, з яких він продукується, таким чином він має видоспецифічність [25, с. 236].

Молекулярна маса молекул інтерферонів має залежність від певного типу і виду тварин, з яких він продукується та відповідно становить 13-170 тис дальтон. На сьогодні продукують кілька видів різноманітних інтерферонів, серед усієї цієї групи найбільш важливе місце мають альфа-, бета- та відповідно гамма-інтерферони (Рис. 1.6).

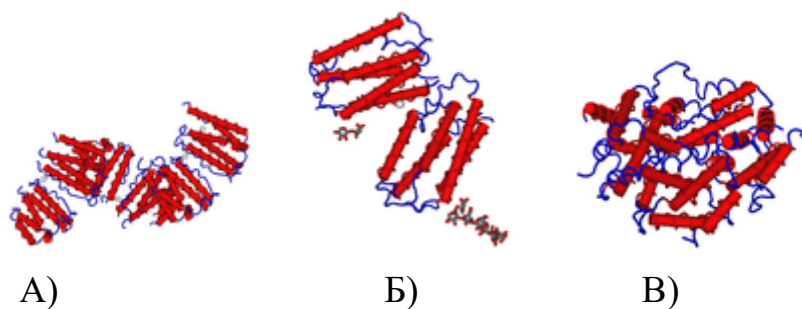


Рис. 1.6. Структура людських інтерферонів

Примітка: А) людський інтерферон альфа; Б) людський інтерферон бета; В) людський інтерферон гамма

Організм людини продукує інтерферони в якому містяться альфа -1, альфа-2- і альфа-3- підвиди інтерферонів. Молекулярна маса цих сполук становить 18-25 тис., а й навіть від 5,5 до 7,5 тис. Особливістю є те, що на N-кінці різних молекул інтерферонів, хахвичай, міститься великий залишок цистеїну. Цей залишок бере участь в процесі утворення дисульфідного зв'язку, що є важливим для його біологічної дії.

Основні інтерферони (IFNs) ділять на три великі групи залежно від того, яким чином та з яким рецептором вони зв'язуються:

1. IFNs першого типу (зв'язок відбувається з рецептором IFNs I типу): $IFN\alpha$, β , δ , ϵ , κ , і ω .
2. IFNs другого типу (зв'язуються з рецептором IFNs II типу): $IFN\gamma$.
3. IFNs третього типу (для роботи зв'язується із специфічним $IFN\lambda$ рецептором): $IFN\lambda$ [39].

Інтерферони та їх рецептори

Тип	Інтерферони	Рецепторні субодниці
Тип I IFN (вірусіндукований)	IFN α , β , δ , ϵ , κ , і ω .	IFNR1 IFNR2
Тип II IFN (імуний)	IFN γ	IFNGR1 IFNGR2
Тип III IFN	IFN λ	IL-10R β IL-28R α

Типи інтерферонів відрізняються не лише за рецепторами, з якими вони взаємодіють, але й клітинами-продуцентами і генетичною мінливістю. У той час як IFN- γ кодується одним геном, IFN- λ має чотири підтипи, а IFN- α має до 14. Інтерферони I типу є найбільш поширеними і можуть продукуватися практично будь-якою клітиною в організмі, хоча IFN- α синтезується в основному макрофагами і дендритними клітинами, а IFN- β продукується переважно фібробластами. Тип II і тип III інтерферонів є набагато більш обмеженими у типах клітин, які можуть їх виробляти і реагувати на них.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали та умови проведення дослідів

З метою з'ясування дії інтерферонів різного походження на актин-міозиновий комплекс м'язів виділили три групи білих мишей лінії Vistar, вагою 15 – 25 г. Експериментальні тварини розташовували у звичайних умовах віварію (при температурі 20 °С, вода *ad libitum*, на с відповідному повноцінному раціоні). Хворих тварин в дослід не брали.

При роботі з тваринами було дотримано всі необхідні Директиви Європейської конвенції про захист хребетних тварин (Страсбург, 1986).

Усі тварини розподілені на три групи:

- 1) контрольна група – інтактні тварини, які отримували фізіологічний розчин того ж об'єму, що й тварини з лаферобіоном;
- 2) експериментальна група 1 мишей, яким було введено лаферобіон (інтерферон альфа-2b рекомбінантний) з питомою активністю 1000000 МЕ;
- 3) Експериментальна група 2 мишей, яким був введений лаферобіон (інтерферон альфа-2b рекомбінантний) з питомою активністю 3000000 МЕ.

2.2. Дослідження актин-міозинового комплексу м'язів в умовах дії інтерферонів різного походження

Зразки м'язів для біохімічного дослідження брали у всіх випадках із лівої та правої задньої лапи миші, а також частково зі спини в області крижового та куприкового відділів. Тканину мілко подрібнювали в ступці до стану м'язової кашки і переходили до біохімічного дослідження. По закінченню дослідження оптичну щільність розчинів вимірювали на приладі КФК-3.

2.3. Методика дослідження дії препарату на ізольованій тканині (м'язі)

Суть методу заключається в тому, що тканину поміщують в спеціальну стерильну посудину і проводять безпосередній вплив досліджуваного препарату на тканину.

Процедура отримання тканини:

- приспати тварину;
- процедура препарування миші;
- звільнення від шкірки нижнього відділу хребта та задніх кінцівок;
- взяття м'язової тканини для досліду з нижнього відділу хребта та задніх кінцівок;
- подріблення м'язової тканини в стерильній ступці до кашкоподібного стану;
- перенесення тканини масою 0,5 г до спеціальної посудини для проведення досліду.

Опис використаного препарату лаферобіону

Склад: діюча речовина: interferon alfa-2b;

«1 ампула або флакон містить: інтерферон альфа-2b рекомбінантний людини, з активністю (1–18)-106 МО, отриманий з клону E. coli шляхом гібридизації плазмиди з геном інтерферону альфа-2b людського лейкоциту; допоміжні речовини: натрію хлорид, декстран-70, калію дигідрофосфат, динатрію фосфат додекагідрат» [25].

Лікарська форма. «Ліофілізат для розчину для ін'єкцій».

Основні фізико-хімічні властивості: «порошок або пориста маса білого кольору; гігроскопічний. Як природний лейкоцитарний інтерферон, має три основні види біологічної активності: імуномодулюючий, антивірусний та протипухлинний» [25].

Фармакотерапевтична група. «Інтерферон альфа-2b. Код АТХ L03A B05». *Фармакологічні властивості.* «Рекомбінантний інтерферон альфа-2b — високоочищений розчинний у воді білок з молекулярною масою 19300

дальтон» [25].

«Дія інтерферону альфа-2b проявляється шляхом його зв'язування зі специфічними рецепторами на поверхневій мембрані клітини та ініціювання комплексу послідовних внутрішньоклітинних реакцій, пов'язаних з індукцією ряду ферментів і реалізацією клітинних функцій, а саме — з пригніченням реплікації вірусу в інфікованій клітині та зниженням проліферації клітин пухлини, з реалізацією імуномодулюючих процесів (таких як підсилення фагоцитарної активності макрофагів, збільшення специфічної цитотоксичності лімфоцитів до клітин-мішеней)» [25].

«Розчин препарату готувати безпосередньо перед його введенням». «У якості розчинника використовувати воду для ін'єкцій. Для приготування розчину вміст ампули розчинити в 1 мл води для ін'єкцій» [25].

2.4. Кількісне визначення вмісту аденозинтрифосфату та креатинфосфату в м'язах

1. 0,5 г м'язової кашки помістили в пробірку, яка стоїть в льодяній бані, і додати 5 мл охолодженого 10-% розчину ТХУ. Вміст пробірки перемішували скляною паличкою для екстракції АТФ та креатинфосфат протягом 5 хв. Екстракт фільтрували в мірну пробірку, що стоїть в льодяній бані. Залишок м'язової кашки в пробірці та відповідно додавали 5 мл дистильованої води і продовжують екстракцію 5 хв у прохолодному місці. Отриманий екстракт фільтрували в ту ж мірну пробірку і збільшували загальний об'єм до 10 мл чистої дистильованої води.

2. В дві пробірки проводили відбір по 0,5 мл безбілкового фільтрату. Перша пробірка — контрольна, друга — дослідна. В пробірку із досліджуваним матеріалом додавали 1 мл 1 моль/л HCL, закривали фольгою, поміщали в киплячу водяну баню і протягом 10 хв проводили гідроліз фосфатних зв'язків. Потім розчини охолоджували і додавали 1 мл 1 моль/л NaOH. В контрольну пробірку (без попереднього кипятіння) додавали 1 мл 1 моль/л HCL і 1 мл 1 моль/л розчину NaOH.

В контрольну та дослідну пробірки додавали з бюретки по 7,5 мл дистильованої води для отримання об'єму 10 мл.

3. Подальші процедури обов'язково проводили одночасно з контрольною та дослідною пробами. Із кожної пробірки відібрав по 5 мл рідини, перемістили в три інші пробірки і додають в кожну з них по 0,5 мл 2,5 % молібдата амонія, 0,5 мл 1%-го розчину аскорбінової кислоти і по 2 мл дистильованої води. Суміш кожної швидко перемішували скляною паличкою і залишали стояти 10 хв.

4. Контрольну та дослідну проби колориметрували на фотоелектроколориметрі з червоним світлофільтром (довжина хвилі 670 нм) на проти води. В дослідній пробі (після гідролізу) визначаємий неорганічний фосфор представляє собою суму лабільно связаного фосфора і фосфатних солей, що присутні в тканинах. В дослідній пробі – тільки фосфатні солі.

5. Враховували із оптичної щільності, знайденої в дослідних пробах, оптичну щільність, отриману для контрольної проби. Концентрацію лабільно зв'язаного неорганічного фосфату в пробі знаходять по калібрувальному графіку.

Розраховували кількість лабільно зв'язаного фосфора в мг на 100 г сирої тканини. Враховуючи розведення по формулі:

$$x = A * 3,3400 * 100; \quad (2.1)$$

де x – вміст макроергічних сполук в перерахунку на 1 мг АТФ в 100 г сирої тканини (мг/100г); A – вміст АТФ в пробі, мг; 3,3400 – коефіцієнт перерахунку на 1 г тканини з урахуванням розведення розчинів [2].

Для побудови калібрувального графіку готували стандартний розчин. В якості стандартного розчину було взято калій дигідрофосфат (KH_2PO_4), оскільки в даній сполуці неорганічний фосфат (Pі) знаходиться в ступені окислення +5. В 1 мл стандартного розчину міститься 0,1 мг Pі [2].

Отримані результати обробляли із використанням методів непараметричної статистики, застосовуючи критерій Мана-Уїтні.

«Непараметрична статистика як галузь математичної статистики дає змогу вивчати випадки, які передбачають нерівномірний або невідомий розподіл показників тестів» [24]. «Непараметричні методи статистики - методи математичної статистики, які застосовують за відсутності функціонального виду генеральних розподілів» [24].

2.5. Вплив інтерферону на ізольоване серце

Дослідження проведені на серцях білих лабораторних мишей ($n=60$) віком 3-4 місяців, масою 20-25 г, які утримувалися на стандартному раціоні. Після проведення цервікальної дислокації ізолювали серце, яке поміщали у охолоджений ($+4\text{ }^{\circ}\text{C}$) розчин Кребса-Хензелейта (рН 7,3-7,4) з гепарином. Відразу проводили канюлювання аорти і починали ретроградну перфузію коронарних судин в умовах постійного тиску 102 ± 2 мм рт. ст. (55 мм. водн. ст.) теплим ($+37^{\circ}\text{C}$) перфузійним розчином Кребса-Хензелейта (склад розчину у ммоль/л: NaCl – 118; KCl – 4,7; MgSO₄ – 1,2; KН₂PO₄ – 1,2; CaCl₂ – 2,5); глюкоза – 5,5; NaHCO₃ – 25) . Перфузійний розчин постійно насичували карбогеном (95% O₂ і 5 % CO₂).

Електричну активність серця досліджували у природному стані, штучна стимуляція не проводилася. Під час перфузії проводили реєстрацію електрограми серця електрокардіографом Мідас ЕК-1Т у II відведенні. Визначення об'ємної швидкості коронарного потоку проводили шляхом вимірювання об'єму витікаючого з серця розчину (мл/хв). В отриманому перфузаті визначали вміст кальцію, креатиніну та глюкози за допомогою набору тест-систем НВП “Філісіт-діагностика” (Україна).

Першу (контрольну) групу складали зразки ізольованого серця ($n=5$), через які пропускали розчин Кребса-Хензелейта. До другої групи відносили

серця (n=5), через які пропускали розчин Кребса-Хензелейта в якому розчиняли ліофілізований препарат рекомбінантного інтерферону- $\alpha 2b$ (“ПАТ Біофарма”, Україна) до концентрації 2000 МО/л [15]. У третій групі (n=5) проводили перфузію (20 хв) розчином Кребса-Хензелейта, який містив інтерферон- $\alpha 2b$ (2000 МО) та подальшу реперфузію розчином з 0,54 мг неселективного β -адреноблокатора пропранололу (ФК «Здоров’я», Україна). Четверту групу (n=5) склали серця, що зазнали перфузію-реперфузію пропранололом. У п’ятій групі (n=5) проводили перфузію розчином пропранололу (20 хв) та подальшу реперфузію розчином інтерферону. Перфузію-реперфузію через серця, які складали шосту групу (n=5), проводили сумішшю препаратів інтерферону і пропранололу в тих самих концентраціях.

Для всіх груп, на початку перфузії ізольоване серце не менше 10 хвилин відмивалося від залишків крові до встановлення постійних показників частоти скорочень. Ішемію-реперфузію ізольованого серця, зануреного у термостатовану ємність з перфузійним розчином, моделювали шляхом повного припинення перфузії протягом 10 хв. Тривалість періодів перфузії та реперфузії складала по 20 хвилин відповідно.

По завершенні реперфузії серце зважувалося та заморожувалося. Для встановлення зони виникнення інфаркту, заморожене серце нарізали кільцями по 1 мм і отримані зрізи інкубували у 1% розчині 2,3,5-трифеніл-тетразолій хлориду в термостаті за температури 37⁰ С, внаслідок чого живі кардіоміоцити забарвлювалися у інтенсивний червоний колір. Надалі зрізи фотографували цифровою фотокамерою та проводили вимірювання площі забарвлених ділянок за допомогою комп’ютерної програми Image J.

Статистичний і графічний аналіз результатів проводили із використанням програми Statistica 6.0., показники виражали у вигляді середнього значення і стандартного відхилення. Достовірність відмінностей визначали за критерієм Манна–Уїтні. Зміни вважалися значимими при $P \leq 0,05$.

РОЗДІЛ 3.

АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

3.1. Вміст макроергічних сполук в м'язах за умов уведення плацебо

Було приготовлено батарею розчинів, що складалася з 7 проб з різною концентрацією неорганічного фосфату в пробі, і визначено оптичну густину кожної з них. Оптимальний час зняття показників – через 10 хвилин, з моменту додавання останнього компонента в пробу (таблиця 3.1).

Таблиця 3.1

Оптична щільність проб з різним вмістом неорганічного фосфору

№ проби	X, мг	Y
1	0,1	0,063
2	0,15	0,078
3	0,2	0,102
4	0,25	0,157
5	0,3	0,273
6	0,4	0,333
7	0,5	0,354
8	0,6	0,369
9	0,7	0,374

Примітка: x – вміст неорганічного фосфору в пробі; y – оптична щільність проби.

За отриманими даними було побудовано калібрувальний графік (рис.

3.1). Взнявши м'язову тканину у вигляді м'язової кашки вагою 0,5 г та перенесли наважку тканини в стерильну пробірку, яка стоїть в льодяній бані, і додали 5 мл охолодженого 10-% розчину ТХУ.

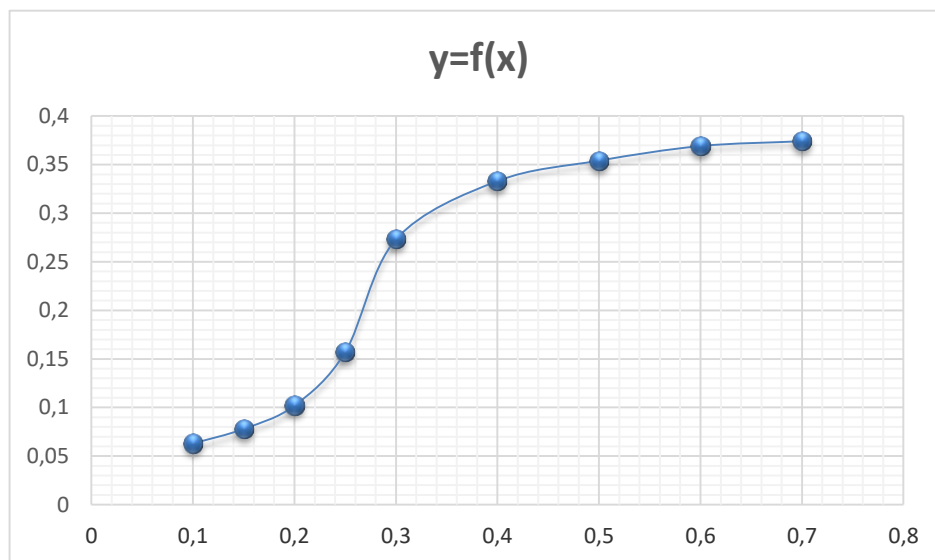


Рис. 3.1. Калібрувальний графік по неорганічному фосфату

Примітка: x – вміст неорганічного фосфору в пробі, y – оптична щільність.

Вміст пробірки перемішували скляною паличкою для екстракції АТФ та креатинфосфат на протязі 5 хв. Екстракт профільтрували в мірну пробірку, що стояла в льодяній бані. Залишок м'язової кашки в пробірці залили 5 мл дистильованої води і продовжували екстракцію 5 хв на холоді. Отриманий екстракт профільтрували в ту ж мірну пробірку і довели загальний об'єм до 10 мл дистильованою водою.

Далі в дві пробірки відібрали по 0,5 мл безбілкового фільтрату. Перша пробірка – контрольна, друга – дослідна. В дослідну пробірку додали 1 мл 1 моль/л HCl , закрили фольгою, помістили в киплячу водяну баню на 10 хв для гідролізу фосфатних зв'язків. Потім розчини охолодили і додали 1 мл 1 моль/л NaOH . В контрольну пробірку (без попереднього кипятіння) додали 1 мл 1 моль/л HCl і 1 мл 1 моль/л розчину NaOH . В контрольну та дослідну пробірку додали із бюретки по 7,5 мл дистильованої води для отримання об'єму 10 мл.

Подальші процедури проводили одночасно з контрольною та дослідною пробами. Із кожної пробірки відібрали по 5 мл рідини, перемістили в три інші пробірки і додали в кожен з них по 0,5 мл 2,5 % молібдата амонія, 0,5 мл 1%-го розчину аскорбінової кислоти і по 2 мл дистильованої води. Суміш кожної швидко перемішали скляною паличкою і залишили стояти 10 хв.

Контрольну та дослідну проби колориметрували на ФЕКі з червоним світлофільтром (довжина хвилі 670 нм) проти води. В дослідній пробі (після гідролізу) визначаємий неорганічний фосфор представляє собою суму лабільно связаного фосфора і фосфатних солей, що присутні в тканинах. В дослідній пробі – тільки фосфатні солі.

Визначили оптичну щільність дослідної та контрольної проб:

1. $E_d = 0,135$
2. $E_k = 0,085$

За калібрувальним графіком визначили вміст неорганічного фосфору в пробах:

1. $R_d = 0,23$ мг
2. $R_k = 0,17$ мг

Провели розрахунок кількості лабільно зв'язаного фосфора в мг на 100 г сиріої тканини за формулою 2.1:

$$X_1 = 0,06 * 3,3400 * 100 = 20 \pm 1,9 \text{ мг}$$

Таким чином, було встановлено стандартний показник вмісту макроергічних сполук в контрольній групі тварин, які отримували фізіологічний розчин у тому ж самому об'ємі, що й інтерферон у експериментальних групах.

3.2. Рівень аденозинтрифосфату та креатинфосфату в м'язах під впливом рекомбінантного інтерферону α -2b з питимою активністю 1 000 000 МО

Взявши м'язову тканину у вигляді м'язової кашки вагою 0,5 г та перенісши наважку тканини в стерильну пробірку обробляли м'язи препаратом рекомбінантного інтерферону α -2b з питомою активністю 1 000 000 МО і виконали методику кількісного визначення макроергічних сполук (АТФ та креатинфосфату). Час дії інтерферону – 10 хв.

Оброблену інтерфероном м'язовий гомогенат вагою 0,5 г переносили в стерильну пробірку, яка перебувала в льодяній бані, і додавали 5 мл охолодженого 10-% розчину три хлороцтової кислоти. Вміст пробірки перемішували скляною паличкою для екстракції АТФ та креатинфосфат на протязі 5 хв. Екстракт профільтрували в мірну пробірку, що стояла в льодяній бані. Залишок м'язового гомогенату в пробірці залили 5 мл дистильованої води і продовжували екстракцію 5 хв на холоді. Отриманий екстракт профільтрували в ту ж мірну пробірку і довели загальний об'єм до 10 мл дистильованою водою.

Далі в дві пробірки відібрали по 0,5 мл безбілкового фільтрату. Перша пробірка – контрольна, друга – дослідна. В дослідну пробірку додали 1 мл 1 моль/л HCL, закрили фольгою, помістили в киплячу водяну баню на 10 хв для гідролізу фосфатних зв'язків. Потім розчини охолодили і додали 1 мл 1 моль/л NaOH. В контрольну пробірку (без попереднього кипятіння) додали 1 мл 1 моль/л HCL і 1 мл 1 моль/л розчину NaOH. В контрольну та дослідну пробірку додали із бюретки по 7,5 мл дистильованої води для отримання об'єму 10 мл.

Подальші процедури проводили одночасно з контрольною та дослідною пробами. Із кожної пробірки відібрали по 5 мл рідини, перемістили в три інші пробірки і додали в кожну з них по 0,5 мл 2,5 % молібдата амонія, 0,5 мл 1%-го розчину аскорбінової кислоти і по 2 мл дистильованої води. Суміш кожної швидко перемішали скляною паличкою і залишили стояти 10 хв.

Контрольну та дослідну проби колориметрували на ФЕКі з червоним

світлофільтром (довжина хвилі 670 нм) проти води. В дослідній пробі (після гідролізу) визначаємий неорганічний фосфор представляє собою суму лабільно связаного фосфора і фосфатних солей, що присутні в тканинах. В дослідній пробі – тільки фосфатні солі.

Отримали оптичну щільність дослідної та контрольної проб:

1. $E_d = 0,064$
2. $E_k = 0,019$

За калібрувальним графіком визначали вміст неорганічного фосфору в пробах:

1. $P_d = 0,102$ мг
2. $P_k = 0,019$ мг

Провели розрахунок кількості лабільно зв'язаного фосфора в мг на 100 г сирієї тканини за формулою 2.1:

$$X_2 = 0,083 * 3,3400 * 100 = 27,722 \text{ мг}$$

Отже, було встановлено, що у м'язах групи тварин, які отримували препарат рекомбінантного інтерферону з біологічною активністю, яка складала 1 млн. міжнародних одиниць, підвищується розщеплення макроергічних сполук (зокрема аденозинтрифосфату та креатинфосфату) під впливом інтерферону в порівнянні з контрольною групою ($20 \pm 0,2$ мг) ($27,7 \pm 5,4$ мг)

3.3. Кількісний вміст макроергічних сполук в м'язах під час дії рекомбінантного інтерферону а-2b з питимою активністю 3 000 000 МО

Взявши м'язову тканину у вигляді м'язового гомогенату вагою 0,5г та перенісши наважку тканини в стерильну пробірку обробляли м'язи

рекомбінантним інтерфероном α -2b з питомою активністю 3000000 МО. Оброблений інтерфероном м'язовий гомогенат надалі переносили в стерильну пробірку і проводили дослідження, аналогічне у випадку з вивченням дії препарату рекомбінантного інтерферону з активністю 1000000 МО.

Контрольну та дослідну проби колориметрували на фотоелектроколориметрі з червоним світлофільтром (довжина хвилі 670 нм) проти води. Визначили оптичну щільність дослідної та контрольної проб:

1. $E_d = 0,056$
2. $E_k = 0,028$

За калібрувальним графіком визначили вміст неорганічного фосфору в пробах:

1. $P_d = 0,082$ мг
2. $P_k = 0,0303$ мг

Після розрахунку кількості лабільно зв'язаного фосфора в мг на 100 г сирієї тканини за формулою 2.1 отримали результат $17,268 \pm 3,4$ мг. Кількісне і відсоткове співвідношення між отриманими даними відображене в таблиці 3.2 (Рис. 3.2, Рис. 3.3).

Таблиця 3.2

Кількісне і відсоткове співвідношення вмісту неорганічного фосфору в контрольній і дослідних пробах ($M \pm m$)

<i>проба</i>	<i>X, мг</i>	<i>співвідношення, %</i>
контроль	$20 \pm 1,9$	100
1 млн. МЕ	$27,722 \pm 5,4$	138,61
3 млн. МЕ	$17,268 \pm 3,4$	86,36

Примітка: X - вміст макроергічних сполук в перерахунку на 1 мг АТФ в 100 г сирієї тканини (мг/100г)

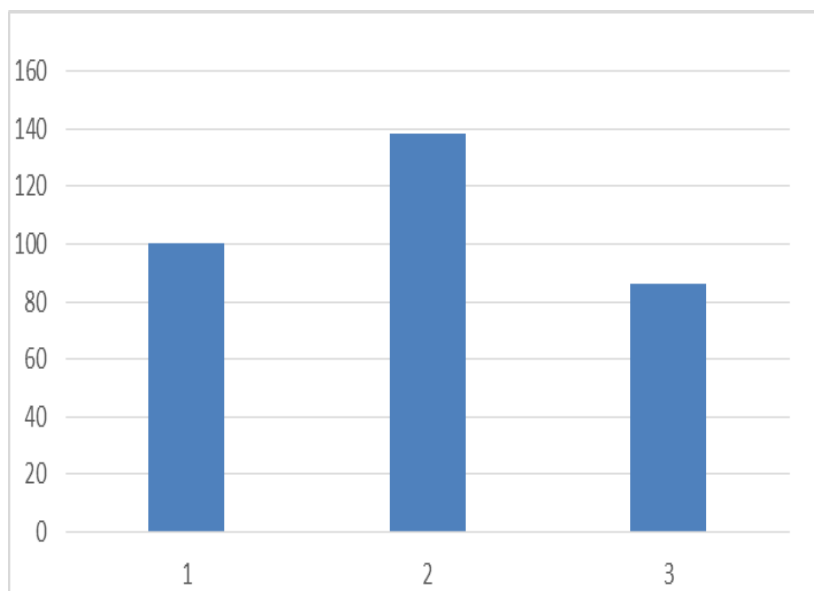


Рис. 3.2. Відсоткове співвідношення вмісту неорганічного фосфору в контрольній і дослідних пробах, %

Примітка: 1. – контрольна проба (100%), 2. – проба 1 млн. МО (138,61%), 3. – проба 3 млн. МО (86,36%)

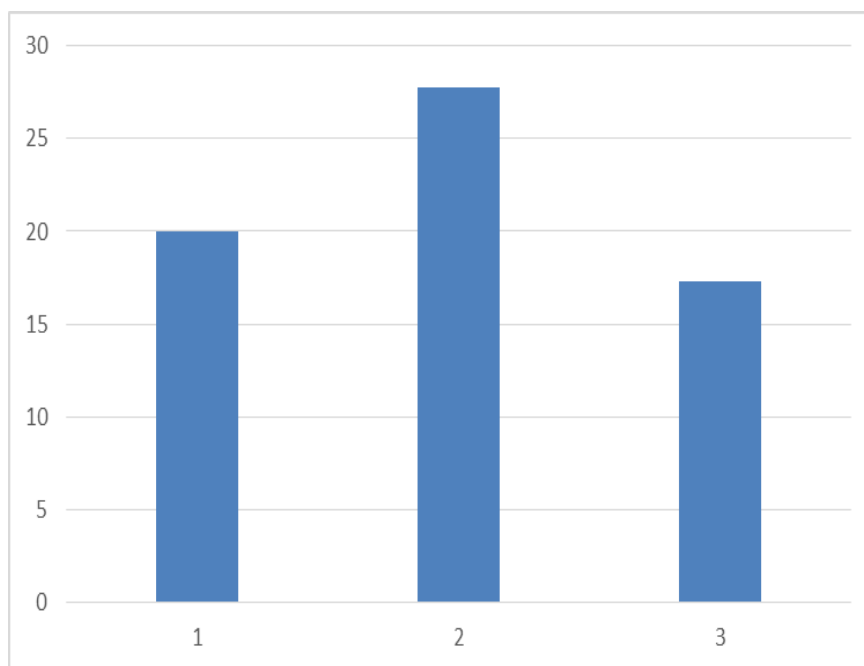


Рис. 3.3. Кількісне співвідношення вмісту неорганічного фосфору в контрольній і дослідних пробах, мг

Примітка: 1. – контрольна проба (20 мг), 2. – проба 1 млн. МО (27,722 мг), 3. – проба 3 млн. МО (17,268 мг)

Актин - міозинний комплекс є наочним прикладом біологічної системи, де відбувається пряме перетворення хімічної енергії в механічну роботу. Крім того, на прикладі м'язової клітини можна добре вивчити і прослідкувати зв'язок процесів на плазматичній мембрані (збудження) з активацією специфічної функції клітини, в даному випадку з активацією скорочення, і роль в цьому процесі регуляторних білків та іонів Ca^{2+} . Актин і міозин наявні у всіх еукаріотичних клітинах. Ці білки забезпечують рух як самих клітин, так і органел всередині них.

Актин-міозинний комплекс за певних умов виконує функцію ферменту, який має здатність до розщеплення макроергічних сполук. Таким чином, про активність актин-міозинового комплексу можна судити за кількістю утвореного ним неорганічного фосфату. В нашому випадку проведені нами дослідження вказують (рис. 3.2) на безпосередній вплив препаратів інтерферону на функціональний стан м'язового волокна.



Рис 3.4. Візуальна відмінність між зразками

Примітка: K1 – контрольна проба (1 000 000 МО), O1 – дослідна проба (1 000 000 МО); K2 – контрольна проба (3 000 000 МО), O2 – дослідна проба (3 000 000 МО).

Інтерферон - складний препарат, який викликає величезну кількість побічних ефектів. Дія препарату на організм вивчена в малій мірі, досі не

визначенні оптимальні дози інтерферону при певних видах захворювань. Особливо цей аспект стосується застосування інтерферону з великою біологічною активністю.

Було встановлено, що введення терапевтичних доз інтерферонів негативно впливає на стан актин-міозинового комплексу. Необхідно відмітити, що несприятливу дію спричиняє інтерферон з біологічною активністю 3 000 000 МО. Це проявляється зниженням АТФ-азної активності актин-міозинового комплексу досліджуваних зразків м'язів тварин, які отримували інтерферон у порівнянні з контрольними. Важливим є те, що у деяких тварин негативний вплив терапевтичної дози інтерферону спричиняв пошкодження коронарних судин, крововиливи.

Разом з тим, вплив рекомбінантного препарату інтерферону з біологічною активністю 1 000 000 МО, навпаки, спричиняв підвищення активності актин-міозинового комплексу м'язового волокна.

Отримані нами дані вказують на те, що введення високих доз препаратів екзогенного інтерферону негативно впливають на роботу м'язів, що може бути обумовлено блокуванням виходу кальцію до саркоплазматичного матриксу під час скорочення міофібрили [5].

3.4. Дія інтерферону на серцевий м'яз

Реєстрація біострумів серця, що є одним із засобів визначення його діяльності, надає інформацію про збудження серцевого м'яза, напрямок і швидкість поширення збудження по міокарду та пов'язаний з цим процесом ритм серцевих скорочень. Проведене порівняння середніх показників значень сили зубця R електрокардіограми показало, що вплив на ізольоване серце розчину інтерферону спричиняє достовірне зниження вольтажу в момент проведення перфузії (на 0,48 мВ) та ішемії (на 0,75 мВ), проте під час реперфузії спричиняє його підвищення (на 0,6 мВ) у порівнянні з контролем (перфузія розчином Кребса-Хензелейта) (рис. 3.5).

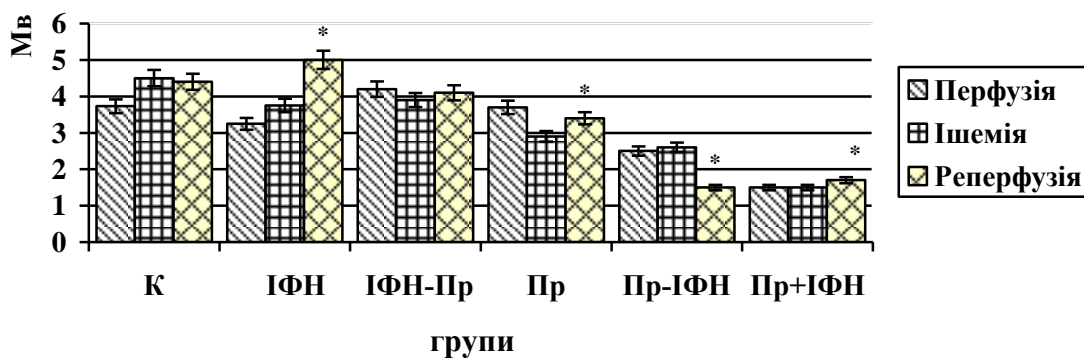


Рис. 3.5. Показники сили зубця R електрокардіограми: К – контроль; ІФН – інтерферон; ІФН-Пр – початкова перфузія інтерфероном (20 хв) та подальша перфузія пропранололом (20 хв); Пр – пропранолол; Пр-ІФН – початкова перфузія пропранололом (20 хв) та подальша реперфузія інтерфероном (20 хв); Пр+ІФН – суміш пропранололу та інтерферону; * – достовірна різниця у порівнянні з контролем ($p \leq 0.05$)

Цікавими виявилися результати порівняння середніх показників перфузії розчинами інтерферону з подальшою перфузією адреноблокатором. Було встановлено, що під час перфузії та реперфузії показники були дещо вищими (на 0,5 та 0,3 мВ відповідно) у порівнянні з контролем, а під час ішемії – нижчими на 0,6 мВ. Порівняння середніх показників перфузії пропранололом розподілялося наступним чином: під час перфузії, у порівнянні з контролем, показник сили зубця R не відрізнявся від контролю, під час ішемії – знизився на 1,6 мВ, за час реперфузії – знизився на 1 мВ.

Початкова перфузія пропранололом та подальша – інтерфероном виявила суттєве зниження сили зубця R на 1,23 мВ, під час ішемії – зниження на 1,9 мВ, під час реперфузії – на 2,9 мВ. Показники при перфузії сумішшю пропранололу та інтерферону в розчині Кребса-Хензелейта у порівнянні з контрольною групою були нижчими: під час перфузії – на 2,23 мВ, ішемії – на 3 мВ, реперфузії – на 2,7 мВ.

Порівняння середніх показників тривалості інтервалів R-R' у контрольній групі показало відсутність значимих відмінностей в період перфузії, ішемії та реперфузії (рис. 3.6).

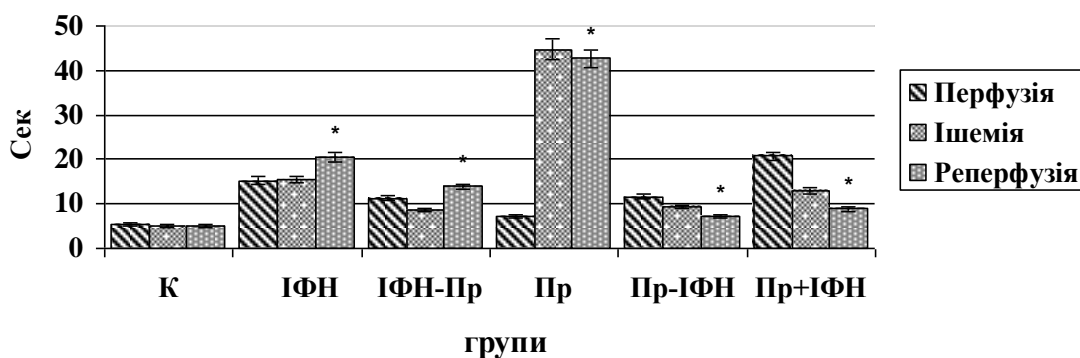


Рис. 3.6. Показники тривалості інтервалів R-R': К – контроль; ІФН – інтерферон; ІФН-Пр – початкова перфузія інтерфероном (20 хв) та подальша перфузія пропранололом (20 хв); Пр- пропранолол; Пр-ІФН – початкова перфузія пропранололом (20 хв) та подальша реперфузія інтерфероном (20 хв); Пр+ІФН – суміш пропранололу та інтерферону; * – достовірна різниця у порівнянні з контролем ($p \leq 0.05$)

Показники, отримані під час перфузії інтерфероном, були істотно вищими за контроль: під час перфузії тривалість інтервалу R-R' збільшилася на 15,3 с., під час ішемії – на 10,5 с., під час реперфузії – на 15,4 с.

Перфузія розчинами інтерферону з подальшою перфузією пропранололом також спричинила збільшення часу генерації зубців R: у порівнянні з контролем під час перфузії інтервал збільшився на 5,8 с., ішемії – на 3,6 с., реперфузії – на 8,9 с. Істотно збільшився інтервал R-R' внаслідок впливу на серце пропранололу: під час перфузії на 1,98 с, ішемії на 39,7 с., реперфузії – на 37,7 с.

Початкова перфузія пропранололом та подальша – інтерфероном виявила: збільшення інтервалів R-R' на 6,3 с; під час ішемії – збільшення на 4,3 с; під час реперфузії – на 2,2 с. Показники перфузії сумішню пропранололу та інтерферону в розчині Кребса-Хензелейта у порівнянні з контрольною групою також були вищими: під час перфузії – на 15,4 с., ішемії – на 7,9 с., реперфузії – на 3,9 с.

Разом зі змінами електрокардіограми, зафіксовані відповідні зміни коронарного потоку у експериментальних групах (рис. 3.7).

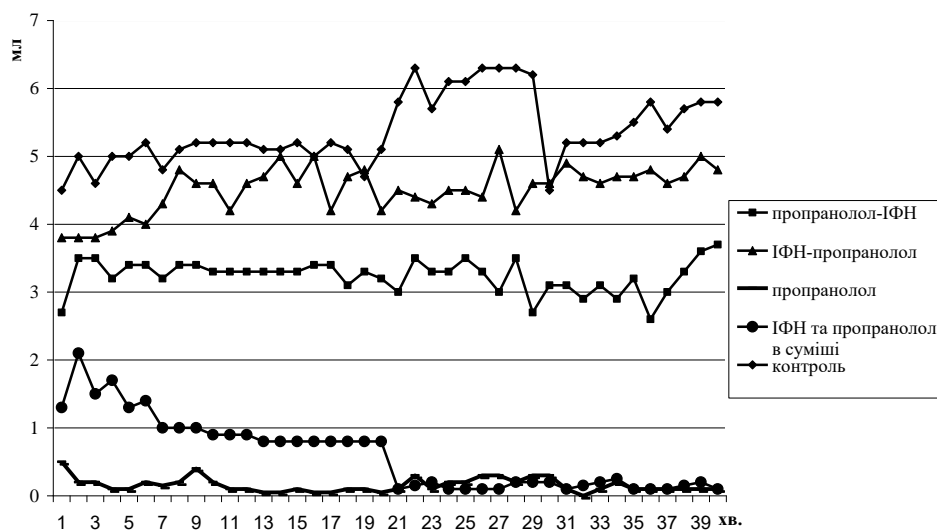


Рис. 3.7. Показники об'ємної швидкості коронарної перфузії. 1-20 хв – перфузія; 21-40 хв – реперфузія після 10 хв. ішемії.

Порівняння показників коронарного потоку в умовах перфузії-реперфузії, показало, що об'ємна швидкість була найменшою під час пропускання розчину пропранололу та під час початкового пропускання інтерферону з подальшою заміною його на пропранолол (див. рис. 3). Відмітимо, що у результаті реперфузії інтерфероном об'ємна швидкість різко знижується відразу після ішемії.

Дослідження метаболічних маркерів у перфузійному розчині, який відтікав від серця, показало суттєвий вплив інтерферону на показники вмісту креатиніну, кальцію та глюкози (в суміші з β -адреноблокатором). Під час дії на серце інтерферону зафіксовано достовірне підвищення виходу креатиніну, який є неодмінним компонентом енергетичного обміну міокарду (рис. 3.8, 3.9).

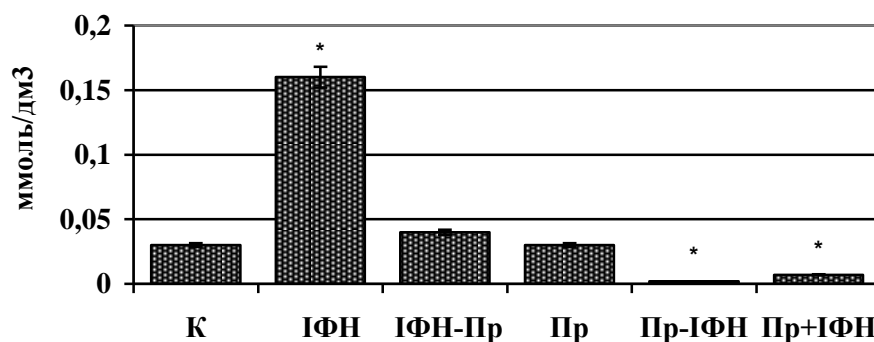


Рис. 3.8. Показники вмісту креатиніну в перфузаті, який відтікав від серця: К – контроль; ІФН – інтерферон; ІФН-Пр – початкова перфузія інтерфероном (20 хв) та подальша перфузія пропранололом (20 хв); Пр- пропранолол; Пр-ІФН - початкова перфузія пропранололом (20 хв) та подальша реперфузія інтерфероном (20 хв); Пр+ІФН – суміш пропранололу та інтерферону; * - достовірна різниця у порівнянні з контролем ($p \leq 0.05$).

Дія на міокард пропранололу та перфузія інтерфероном з подальшим впливом β -адреноблокатору, не спричиняла достовірних відмінностей вмісту креатиніну в перфузійному розчині у порівнянні з контролем.

Натомість, дія на серце β -адреноблокатору з подальшою перфузією інтерфероном, а також сумішню інтерферону з пропранололом спричиняли зниження показників екскреції креатиніну в порівнянні з контролем. Цілком імовірно є те, що за цих умов β -адреноблокатор спричиняє пригнічення виходу креатиніну з кардіоміоцитів, знижуючи частоту і силу серцевих скорочень та потребу міокарду у кисні.

Відомо, що інтенсивність виділення креатиніну підвищується під час ішемічних ушкоджень серцевого м'яза [16, 17]. Ймовірно, перфузія інтерфероном значно підсилює ішемічні пошкодження: спостерігається втрата креатиніну, що спричиняє суттєве ослаблення процесу транспорту енергії в кардіоміоцитах за допомогою креатинкіназної системи.

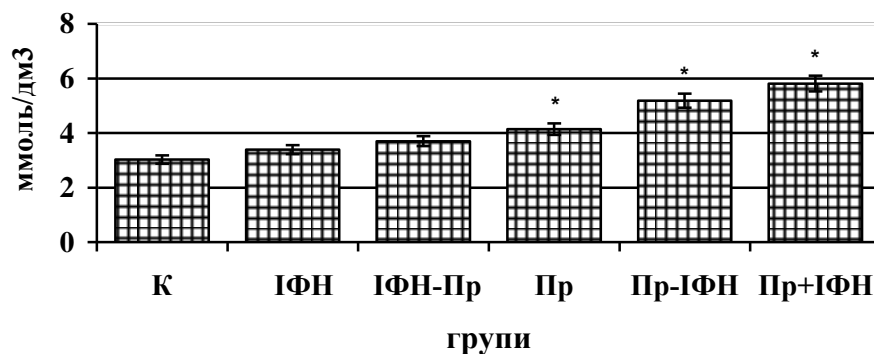


Рис. 3.9. Порівняння показників вмісту глюкози у перфузійному розчині

Примітка: К – контроль; ІФН – інтерферон; ІФН-Пр – початкова перфузія інтерфероном (20 хв) та подальша перфузія пропранололом (20 хв); Пр- пропранолол; Пр-ІФН - початкова перфузія пропранололом (20 хв) та подальша реперфузія інтерфероном (20 хв); Пр+ІФН – суміш пропранололу та інтерферону; * - достовірна різниця у порівнянні з контролем ($p \leq 0.05$).

Разом з тим, споживання глюкози перфузованим серцем достовірно ($p \leq 0.05$) знижувалося у випадках додавання β -адреноблокатора пропранололу.

Цікавими виявилися результати вивільнення кальцію під час проведення перфузії серця інтерфероном та пропранололом (рис. 3.10).

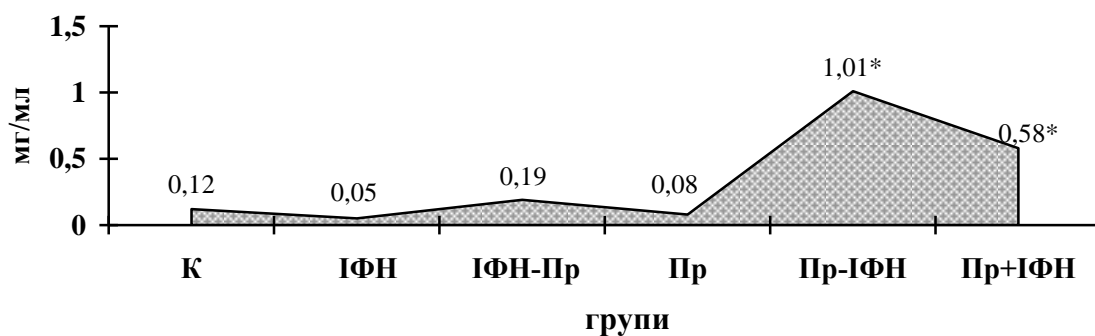


Рис. 3.10. Вивільнення кальцію у перфузат, який відтікав від серця

Примітка: К – контроль; ІФН – інтерферон; ІФН-Пр – початкова перфузія інтерфероном (20 хв) та подальша перфузія пропранололом (20 хв); Пр- пропранолол; Пр-ІФН - початкова реперфузія пропранололом (20 хв) та подальша перфузія інтерфероном (20 хв); Пр+ІФН – суміш пропранололу та інтерферону; * - достовірна різниця у порівнянні з контролем ($p \leq 0.05$).

Було встановлено, що початкова перфузія пропранололом (20 хв) та подальша реперфузія інтерфероном (20 хв) і перфузія сумішшю

пропранололу та інтерферону спричиняла більше вивільнення кальцію, в порівнянні з контролем. Дія інтерферону цього ефекту не спричиняла, а навпаки - пригнічувала.

Цікавими виявилися результати визначення частки некрозу препарату ізольованого серця, спричиненого уведенням інтерферону та β -адреноблокатору під час перфузії-реперфузії. Зокрема, повна перфузія розчином з інтерфероном, пропранололом, початкова перфузія пропранололом з подальшою реперфузією розчином інтерферону та повна перфузія суміші пропранололу та інтерферону спричиняє зниження об'єму некрозу, особливо у останньому випадку. Проте, початкова перфузія розчином інтерферону та реперфузія пропранололом спричиняла збільшення ділянки некрозу (табл.1).

Проведені нами дослідження показують, що розчин рекомбінантного інтерферону- $\alpha 2b$ впливає на препарат ізольованого серця, спричиняючи зміни електричної активності: зниження вольтажу зубця R; збільшення часу його виникнення; зниження об'ємної швидкості коронарної перфузії у порівнянні з контролем. Ймовірно, інтерферон призводить до збільшеного вивільнення креатиніну з серцевого м'яза на тлі підвищення депонування кальцію у серцевому м'язі. Ми розглядаємо імовірність того, що вихід креатиніну у міжклітинний простір з подальшим його вимиванням призводить до зниження ресинтезу АТФ.

Таблиця 3.1.

Частка некрозу (%) тканин серця по завершенні реперфузії ($M \pm m$)

Групи	Зріз на рівні шлуночків	Зріз на рівні верхівки
Контроль	43,3 \pm 2,2	76,7 \pm 3,7
Інтерферон	18,3 \pm 0,9*	57,7 \pm 3,0*
Інтерферон→пропранолол	55,0 \pm 2,8*	90,2 \pm 4,4*
Пропранолол	13,4 \pm 0,6**	20,1 \pm 1,0**
Пропранолол→інтерферон	15,2 \pm 0,7*	50,4 \pm 2,4*
Пропранолол +інтерферон	5,1 \pm 0,2**	15,2 \pm 0,7**

* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$ – достовірність порівняно з контролем.

Відомо, що кардіоміоцити та гладенькі м'язи клітин судин особливо чутливі до блокади трансмембранного потоку Ca^{2+} , це зумовлено малим запасом кальцію в саркоплазматичному ретикулумі [18-20]. Разом з тим, в умовах ішемії відбувається депонування кальцію в мітохондріях, у результаті чого відбувається зниження рівня внутрішньоклітинного кальцію. Можливим учасником процесів депонування кальцію ми вважаємо молекули інтерферон-індукуючого PLCR-1 кальцій- зв'язуючого мембранного білку. Скоріш за все, у ішемізованому міокарді відбувається перенавантаження мітохондрій кардіоміоцитів, оскільки вони володіють найбільшою кальцієвою ємністю.

Необхідно відзначити, що сумісний вплив інтерферону та неселективного блокатору β -адренорецепторів зумовлює показники, подібні з контролем. Разом з тим, “швидкий” ефект інтреферону у поєднанні з блокатором β -адренорецепторів може спричиняти зниження рівня утворення цАМФ з АТФ. Також можливий ефект одночасної дії інтерферону з адреноблокатором, спричинений блокуванням Na/K-ATP -ази [21].

Інтерферон та пропранолол спричиняють “вимивання” Ca^{2+} , що зменшує кальцій-залежне розщеплення АТФ, силу скорочення та потребу в кисні. Зниження виходу креатиніну, на нашу думку, вказує на пригнічення процесу транспорту енергії в кардіоміоцитах (підтверджується зниженням поглинання глюкози з перфузійного розчину), порушеннях креатинкіназної системи.

Разом з тим, спільними ефекторними ферментами як для інтерферону, так і для блокатору адренорецепторів є протеїнкінази. Можливий механізм їхньої вищезазначеної сумісної дії пов'язаний з тим, що субодиноці кальцієвих каналів L- типу є субстратами протеїнкіназ. Безпосередня інактивація кальцієвих каналів і спричиняє вихід йонів кальцію з кардіоміоцитів у перфузійний розчин. Отримані дані вказують на

внутрішньосерцевий механізм реалізації пригнічуючої дії під час значного підвищення рівня інтерферону.

ВИСНОВКИ

1. Екзогенні рекомбінантні інтерферони, володіючи антивірусною, антипроліферативною, антипухлинною та імуномодуляторною активністю, спричиняють значну кількість плейотропних ефектів, таких, як «грипоподібний» синдром: озноб, тремор, головний біль, загальне нездужання, міалгія, порушення з боку системи кровотворення, центральної нервової системи, серцево-судинної, шлунково-кишкового тракту, викликає алергічні реакції.

2. Визначення вмісту макроергічних сполук у м'язах за умов введення плацебо показали, що рівень макроергічних сполук в даному випадку складає $20 \pm 1,9$ мг в перерахунку на 100 г сирової тканини.

3. Дослідження рівня аденозинтрифосфату та креатинфосфату в м'язах під впливом рекомбінантного інтерферону α -2b з питомою активністю 1 000 000 МО показали, що рівень макроергічних сполук в даному випадку складає $27,722 \pm 5,4$ мг в перерахунку на 100 г сирової тканини. Відсоткове співвідношення складає 138,61%, порівнюючи з нормою, що вказує на підвищення активності актин-міозинового комплексу.

4. Визначення вмісту макроергічних сполук у м'язах під час дії рекомбінантного інтерферону α -2b з питомою активністю 3 000 000 МО показали, що рівень макроергічних сполук в даному випадку складає $17,268 \pm 3,4$ мг. Відсоткове співвідношення, у порівнянні з нормою, складає 86,36%. Зниження цих показників може бути обумовлено блокуванням виходу кальцію до саркоплазматичного матриксу під час скорочення міофібрили, що спричиняє виникнення спазмів, судом та міальгій.

5. Розчин рекомбінантного інтерферону спричиняє зниження вольтажу електрограми ізольованого серця в момент проведення перфузії та ішемії, проте під час реперфузії спричиняє його підвищення. Перфузія розчинами інтерферону та реперфузія адреноблокатором показала підвищення, значення зубця R, а під час ішемії – його зниження. Початкова

перфузія β -адреноблокатором та реперфузія інтерфероном, а також їхньою сумішшю, призводить до суттєвого зниження сили зубця R. Під час перфузії-реперфузії інтерфероном відбувається збільшення тривалості інтервалу R-R'. Перфузія розчинами інтерферону з подальшою реперфузією β -адреноблокатором пропранололом, початкова перфузія β -адреноблокатором та реперфузія інтерфероном, а також їхня суміш в розчині Кребса-Хензелейта призводила до збільшення періодів генерації зубців R.

Швидкість коронарного потоку була найменшою у випадку пропускання розчину β -адреноблокатору пропранололу та під час початкового пропускання інтерферону з подальшою реперфузією β -адреноблокатором. Перфузія розчином інтерферону спричиняє посилення виходу креатиніну з серцевого м'яза. Сумісний вплив на серце β -адреноблокатору та інтерферону призводили до зниження показників екскреції креатиніну та споживання глюкози серцем. Додавання інтерферону до перфузійного розчину призводило до зниження вивільнення кальцію з кардіоміоцитів, проте перфузія пропранололом, реперфузія інтерфероном і перфузія їхньою сумішшю посилювало елімінацію кальцію з серця. Повна перфузія розчином з інтерфероном, β -адреноблокатором, початкова перфузія β -адреноблокатором з подальшою реперфузією розчином інтерферону та повна їхня сумісна перфузія спричиняє зниження площі некрозу. Проте, початкова перфузія розчином інтерферону та реперфузія β -адреноблокатором спричиняла значне збільшення ділянки некрозу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Baron S. (1994). The dream for interferon. [Hokkaido igaku zasshi] The Hokkaido journal of medical science, 69(6), 1294–1300.
2. Billiau, A., & Matthys, P. (2009). Interferon- γ : a historical perspective. *Cytokine & growth factor reviews*, 20(2), 97-113.
3. Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., & Howard, J. C. (1997). Cellular responses to interferon- γ . *Annual review of immunology*, 15(1), 749-795.
4. Borden, E. C., & Williams, B. R. (2011). Interferon-stimulated genes and their protein products: what and how?. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 31(1), 1–4. <https://doi.org/10.1089/jir.2010.0129>
5. Borecký, L., & Fuchsberger, N. (1983). Interferon as therapeutic agent. *Acta virologica*, 27(4), 359–370.
6. Brassard, D. L., Grace, M. J., & Bordens, R. W. (2002). Interferon- α as an immunotherapeutic protein. *Journal of leukocyte biology*, 71(4), 565-581.
7. Cantell K. (1977). Interferoni [Interferon]. *Duodecim; laaketieteellinen aikakauskirja*, 93(7), 410–420.
8. Carrick D. M. (2019). Interferon Lambda: An Immune System Factor That Cancer Epidemiologists Should Consider. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 39(10), 592–593. <https://doi.org/10.1089/jir.2019.0033>
9. Chow, K. T., & Gale, M., Jr (2015). SnapShot: Interferon Signaling. *Cell*, 163(7), 1808–1808.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.008>
10. Chu T. S. (1974). *Zhonghua yi xue za zhi*, (9), 576–579.
11. De Andrea, M., Ravera, R., Gioia, D., Gariglio, M., & Landolfo, S. (2002). The interferon system: an overview. *European Journal of Paediatric Neurology*, 6, A41-A46.
12. De Clercq E. (2006). Interferon and its inducers--a never-ending story: "old" and "new" data in a new perspective. *The Journal of infectious diseases*, 194 Suppl 1(Suppl 1), S19–S26. <https://doi.org/10.1086/505351>

13. Devasthanam A. S. (2014). Mechanisms underlying the inhibition of interferon signaling by viruses. *Virulence*, 5(2), 270–277. <https://doi.org/10.4161/viru.27902>
14. Dianzani, F., & Dolei, A. (1987). Il sistema interferon [The interferon system]. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*, 23(4), 765–768.
15. Dianzani, F., Antonelli, G., & Capobianchi, M. R. (1990). The biological basis for clinical use of interferon. *Journal of hepatology*, 11 Suppl 1, S5–S10. [https://doi.org/10.1016/0168-8278\(90\)90156-1](https://doi.org/10.1016/0168-8278(90)90156-1)
16. Doshi, H. V., & Shah, S. S. (1972). Interferon. *Indian journal of medical sciences*, 26(11), 759–769.
17. Einhorn, S., & Strander, H. (1993). Interferon treatment of human malignancies--a short review. *Medical oncology and tumor pharmacotherapy*, 10(1-2), 25–29. <https://doi.org/10.1007/BF02987765>
18. Finkelstein, M. S., & Merigan, T. C. (1968). Interferon--1968. How much do we understand?. *California medicine*, 109(1), 24–34.
19. Goldstein, D., & Laszlo, J. (1988). The role of interferon in cancer therapy: a current perspective. *CA: a cancer journal for clinicians*, 38(5), 258–277. <https://doi.org/10.3322/canjclin.38.5.258>
20. Gordon, J., & Minks, M. A. (1981). The interferon renaissance: molecular aspects of induction and action. *Microbiological reviews*, 45(2), 244–266. <https://doi.org/10.1128/mr.45.2.244-266.1981>
21. Gresser I. (1989). Antitumor effects of interferon. *Acta oncologica* (Stockholm, Sweden), 28(3), 347–353. <https://doi.org/10.3109/02841868909111205>
22. Gresser I. (1997). Wherefore interferon?. *Journal of leukocyte biology*, 61(5), 567–574. <https://doi.org/10.1002/jlb.61.5.567>
23. Hadden J. W. (1976). New interferon laboratories. *Clinical bulletin*, 6(3), 114–115.
24. Hararda, T., Fukami, H., Takeuchi, T., Niwa, T., & Majima, Y. (1995). Interferone-assozierte Retinopathie [Interferon-associated retinopathy].

- Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde, 207(5), 302–304.
<https://doi.org/10.1055/s-2008-1035383>
25. Hertzog, P., Forster, S., & Samarajiwa, S. (2011). Systems biology of interferon responses. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 31(1), 5–11. <https://doi.org/10.1089/jir.2010.0126>
 26. Ho M. (1982). Recent advances in the study of interferon. *Pharmacological reviews*, 34(1), 119–129.
 27. Ho M. (1990). Interferon as an agent against herpes simplex virus. *The Journal of investigative dermatology*, 95(6 Suppl), 158S–160S. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12875164>
 28. Ho, M., & Armstrong, J. A. (1975). Interferon. *Annual review of microbiology*, 29, 131–161. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.29.100175.001023>
 29. Hood L. E. (1987). Interferon. *The American journal of nursing*, 87(4), 459–465.
 30. Horoszewicz J. S. (1984). Interferon. *The Prostate*, 5(2), 213–219. <https://doi.org/10.1002/pros.2990050211>
 31. Houglum J. E. (1983). Interferon: mechanisms of action and clinical value. *Clinical pharmacy*, 2(1), 20–28.
 32. Interferon options. (1977). *British medical journal*, 1(6053), 64–65.
 33. Interferon. (1970). *Lancet (London, England)*, 2(7681), 1022–1023.
 34. Isaacs, A., & Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences*, 147(927), 258-267.
 35. Jemma C. (1981). Interferone e immunita umorale [Interferon and humoral immunity]. *Recenti progressi in medicina*, 70(1), 1–24.
 36. Kaempfer R. (1998). Cytokine and interferon research in Israel. *Cytokine & growth factor reviews*, 9(2), 99–108. [https://doi.org/10.1016/s1359-6101\(98\)00008-2](https://doi.org/10.1016/s1359-6101(98)00008-2)

37. Koenig E. L. (1970). Interferon: a review. *Delaware medical journal*, 42(1), 4–8.
38. Kontsek, P., & Kontseková, E. (1997). Forty years of interferon. *Acta virologica*, 41(6), 349–353.
39. Kontsek, P., Karayianni-Vasconcelos, G., & Kontseková, E. (2003). The human interferon system: characterization and classification after discovery of novel members. *Acta virologica*, 47(4), 201–215.
40. Kunzi, M. S., & Pitha, P. M. (2005). Interferon research: a brief history. *Methods in molecular medicine*, 116, 25–35. <https://doi.org/10.1385/1-59259-939-7:025>
41. Larner, A., & Reich, N. C. (1996). Interferon signal transduction. *Biotherapy* (Dordrecht, Netherlands), 8(3-4), 175–181. <https://doi.org/10.1007/BF01877202>
42. Leszek J. (1992). Interferonowa teoria schizofrenii [Interferon theory of schizophrenia]. *Psychiatria polska*, 26(5), 381–387.
43. McNair, A. N., & Kerr, I. M. (1992). Viral inhibition of the interferon system. *Pharmacology & therapeutics*, 56(1), 79–95. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(92\)90038-2](https://doi.org/10.1016/0163-7258(92)90038-2)
44. Mellstedt, H. A. M. G. B. H., Björkholm, M., Johansson, B., Ahre, A., Holm, G., & Strander, H. (1979). Interferon therapy in myelomatosis. *The Lancet*, 313(8110), 245-247.
45. Metz D. H. (1975). Interferon and interferon inducers. *Advances in drug research*, 10, 101–156.
46. Moore G. E. (1981). Interferon. *Surgery, gynecology & obstetrics*, 153(1), 97–102.
47. Oddo F. G. (1966). L'interferone [Interferon]. *Rivista dell'Istituto sieroterapico italiano*, 41(2), 92–119.
48. Okamura, H., Kashiwamura, S. I., Tsutsui, H., Yoshimoto, T., & Nakanishi, K. (1998). Regulation of interferon- γ production by IL-12 and IL-18. *Current opinion in immunology*, 10(3), 259-264.

49. Olsen, E. A., & Bunn, P. A. (1995). Interferon in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Hematology/oncology clinics of North America*, 9(5), 1089–1107.
50. Pestka, S., Krause, C. D., & Walter, M. R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological reviews*, 202, 8–32. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x>
51. Pitha P. M. (1997). Reflections on the years in interferon research. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 17(4), 181–184. <https://doi.org/10.1089/jir.1997.17.181>
52. Preble, O. T., & Friedman, R. M. (1983). Interferon-induced alterations in cells: relevance to viral and nonviral diseases. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 49(1), 4–18.
53. Richtsmeier W. J. (1984). Interferon--present and future prospects. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 20(1), 57–93. <https://doi.org/10.3109/10408368409165770>
54. Sen, G. C., & Ransohoff, R. M. (1993). Interferon-induced antiviral actions and their regulation. *Advances in virus research*, 42, 57–102. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(08\)60083-4](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(08)60083-4)
55. Smith, J. G., Jr, & Yancey, K. B. (1980). Interferon. *Southern medical journal*, 73(8), 963–964. <https://doi.org/10.1097/00007611-198008000-00001>
56. Spiegel R. J. (1987). Clinical overview of alpha interferon. *Studies and future directions. Cancer*, 59(3 Suppl), 626–631. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19870201\)59:3+<626::aid-cncr2820591310>3.0.co;2-d](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19870201)59:3+<626::aid-cncr2820591310>3.0.co;2-d)
57. Tan Y. H. (1982). Interferon: no verdict yet. *Canadian Medical Association journal*, 126(1), 9.

58. Tăriceanu V. (1987). Sistemul interferon [The interferon system]. *Viata medicala; revista de informare profesionala si stiintifica a cadrelor medii sanitare*, 35(12), 265–270.
59. Tigaud, J. M., Duarte, A., Psyche, S., & Droz, J. P. (1991). L'interféron [Interferon]. *Revue de l'infirmiere*, 41(19), 32–33.
60. Trofatter K. F., Jr (1987). Interferon. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*, 14(2), 569–579.
61. Uno K. (2006). *Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine*, 64(7), 1210–1214.
62. van Helden P. D. (1983). Interferon--the clinical experience. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde*, 63(20), 773–775.