

УДК 612.173: 612.174

Бесчасний С.П., Найдьонов М.М., Гасюк О.М.

## РЕАКЦІЯ МАСТОЦИТІВ НА ПЕРФУЗІЮ СЕРЦЯ РОЗЧИНОМ ІНТЕРФЕРОНУ

Херсонський державний університет, м.Херсон

E-mail: gasuk@ksu.ks.ua

*Ключові слова:* рекомбінантний інтерферон- $\alpha 2b$ ,  $\beta$ -адреноблокатор пропранолол, перфузія серця.

Інтерферони (ІФН) є ендogenousними поліпептидами, які продукуються клітинами імунної системи у відповідь на розвиток вірусної інфекції, злякисне перетворення соматичних клітин, проникнення бактерій в організм. Відкрита у 1973 році здатність людських лімфоцитів продукувати інтерферони, відразу привернула увагу дослідників і через деякий час ці цитокіни почали розглядати як майбутню панацею від багатьох хвороб. Запровадження рекомбінантних методів отримання препаратів інтерферону зробило його доступним для широкого клінічного застосування при лікуванні проліферативних неоплазій, резистентних вірусних інфекцій тощо [5, 14, 15, 19]. Необхідно зазначити, що широкий спектр дії інтерферонів обумовлений експресією рецепторів до них майже на всіх клітинах організму [7, 13, 21]. Разом з тим, часто зустрічаються повідомлення про побічні ефекти інтерферонотерапії, зокрема, з боку серцево-судинної системи [3, 4, 6, 9, 10, 12, 16, 17, 18, 20]. Існує думка, що молекули інтерферону мають властивість активувати  $\beta$ -адренорецептори кардіоміоцитів, обумовлюючи неімунні ефекти зі сторони серцево-судинної системи [8].

Відомо, що одними із високоспеціалізованих ефекторних клітин імунної системи, здатних продукувати молекули інтерферону і, відповідно, реагувати на його введення, є мастоцити. Ці клітини зустрічаються майже у всіх тканинах і розташовуються у безпосередній близькості до кардіоміоцитів, кровоносних та лімфатичних судин. Здатність синтезувати значну кількість біологічно активних речовин (таких як гістамін, гепарин тощо), спричиняє вплив на функціональний стан серцевого м'яза [2, 11].

Мета нашого дослідження полягала у визначенні безпосереднього впливу препарату рекомбінантного інтерферону- $\alpha 2b$  на мастоцити ізольованого серця миші в умовах ішемії-реперфузії у поєднанні з дією неселективного адреноблокатора пропранололу.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження проведені на серцях білих лабораторних мишей (n=30) віком 3-4 місяців, масою 20-25 г, які утримувалися на стандартному раціоні. Після проведення цервікальної дислокації ізолювали серце, яке поміщали у охолоджений (+4 °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 (55 мм. водн. ст.) теплим (+37<sup>0</sup>C) перфузійним розчином Кребса-Хензелейта (склад розчину у ммоль/л: NaCl – 118; KCl – 4,7; MgSO<sub>4</sub> – 1,2; KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,2; CaCl<sub>2</sub> - 2,5); глюкоза – 5,5; NaHCO<sub>3</sub> – 25) . Перфузійний розчин постійно насичували карбогеном ( 95% O<sub>2</sub> і 5 % CO<sub>2</sub>).

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-α2b (“ПАТ Біофарма”, Україна) до концентрації 2000 МО/л [15]. У третій групі (n=5) проводили перфузію (20 хв) розчином Кребса-Хензелейта, який містив інтерферон-α2b (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.

Для визначення активності мастоцитів у тканині серця, препарати заливали у парафін для подальшого приготування зрізів і фарбування їх спиртовим розчином толуїдинового синього [11]. Під імерсійним об’єктивом знаходили у 10-ти полях зору мастоцити та фотографували їх цифровою камерою-окуляр-мікрометром eTREK DCM 320 3.0 M та оцінювали ступінь активації за показниками діаметру, площі, забарвлення 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  $P \leq 0,05$ .

### ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Порівняння морфометричних показників резидентних мастоцитів тканини серця показало певні відмінності з контролем. Було проаналізовано дві групи показників: ті, що характеризують розміри, та ті,

які дозволяють оцінити особливості забарвлення досліджуваних мастоцитів.

Площа мастоцитів у препаратах контрольної групи складала  $611,93 \pm 27,45$  мкм<sup>2</sup>. Достовірно більшою ( $725,55 \pm 41,39$  мкм<sup>2</sup>,  $p \leq 0,05$ ) була площа клітин у препаратах міокарда, які зазнали перфузії розчином інтерферону з пропранололом. У інших випадках достовірних відмінностей встановлено не було (табл. 1).

Таблиця 1

**Показники розмірів мастоцитів ізольованого серця в умовах перфузії інтерфероном- $\alpha 2b$  та неселективним блокатором  $\beta$ -адренорецепторів,  $M \pm m$**

Групи	Показники розмірів клітин					
	Area	Perimeter	Major	Minor	Circularity	AR
Контроль	611,93 $\pm 27,45$	63,42 $\pm 2,61$	18,50 $\pm 0,73$	13,26 $\pm 0,53$	0,65 $\pm 0,02$	1,44 $\pm 0,03$
Інтерферон	686,83 $\pm 39,29$	66,20 $\pm 2,33$	19,72 $\pm 0,66$	13,67 $\pm 0,5$	0,63 $\pm 0,01^{\$}$	1,52 $\pm 0,03$
Інтерферон →пропранолол	602,99 $\pm 45,93$	61,31 $\pm 6,12$	19,30 $\pm 1,68$	13,12 $\pm 0,87$	0,72 $\pm 0,03^{\$*#\wedge}$	1,46 $\pm 0,06$
Інтерферон + пропранолол	725,55 $\pm 41,39^{\#\$}$	71,38 $\pm 4,22^{\$}$	21,83 $\pm 1,30^{\$}$	14,14 $\pm 0,72^{\#}$	0,63 $\pm 0,02^{\$}$	1,57 $\pm 0,05^{\$}$
Пропранолол	638,66 $\pm 28,06$	63,74 $\pm 3,72$	19,23 $\pm 0,94$	12,01 $\pm 0,55$	0,61 $\pm 0,02^{\$}$	1,65 $\pm 0,06^{\$*}$
Пропранолол →інтерферон	692,20 $\pm 35,84$	79,42 $\pm 12,9$	21,37 $\pm 2,22$	14,01 $\pm 1,16^{\#}$	0,60 $\pm 0,05^{\$}$	1,53 $\pm 0,11$

Примітки: Area – площа клітин, мкм<sup>2</sup>; Perimeter – периметр клітин, мкм; Major – велика вісь, мкм; Minor – мала вісь, мкм; Circularity – округлість, у.о.; AR – співвідношення основної вісі до малої вісі, у.о. відмінність у порівнянні: & - з контролем; \* - з групою «Інтерферон»; ♦ - з групою «Інтерферон→пропранолол»; ^ - з групою «Інтерферон + пропранолол»; # - з групою «Пропранолол»; \$ - з групою «Пропранолол→інтерферон». Достовірність різниці -  $p \leq 0,05$

Периметр мастоцитів у контролі складав  $63,42 \pm 2,61$  мкм. Достовірно більшим ( $71,38 \pm 4,22$  мкм,  $p \leq 0,05$ ) він також був лише у клітин із препаратів міокарду після перфузії розчином інтерферону з пропранололом, а у інших випадках не відрізнявся від контрольних показників.

Аналізуючи дані довжини великої та малої вісі клітин, ми з'ясували, що велика вісь достовірно збільшується лише після перфузії розчином інтерферону з пропранололом (відповідно,  $18,50 \pm 0,73$  мкм - у контролі;  $21,83 \pm 1,30$  мкм, – у експерименті,  $p \leq 0,05$ ). Величина малої вісі клітин не зазнала суттєвих змін в ході експерименту.

Описуючи форму клітин, ми з'ясували, що лише у випадку послідовної перфузії інтерфероном та пропранололом форма клітин

ставала достовірно більш округлою. В усіх інших експериментальних умовах форма клітин була достовірно ( $p \leq 0,05$ ) подовженою. Показник відношення великої та малої вісі клітин змінювався різноспрямовано, але у випадках перфузії розчинами, що містили інтерферон з пропранололом та окремо пропранолол, підтвердив тенденцію до зміни форми клітин у бік видовженості.

Отже, показники лінійних розмірів та площі клітин, після порівняння контролю та експериментальних груп, збільшувалися тільки при послідовному впливі інтерферону та блокатора  $\beta$ -адренорецепторів пропранололу. Інші впливи давали лише невеликі зміни форми клітин.

Для оцінки активації мастоцитів ми порівняли показники інтенсивності забарвлення клітин у тих же дослідних групах (рис. 1).

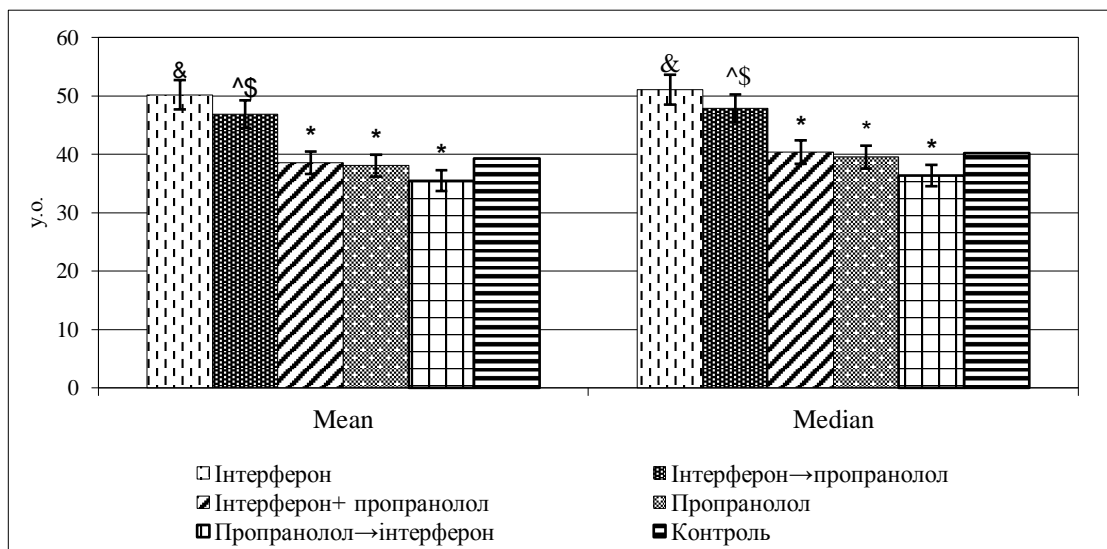


Рис. 1. Порівняння інтенсивності забарвлення мастоцитів різних експериментальних груп,  $M \pm m$

Примітки: Mean – усереднене значення сірих пікселів, у.о.; Median – середнє значення пікселів на зображенні, у.о.; відмінність у порівнянні: & - з контролем; \* - з групою «Інтерферон»; ♦ - з групою «Інтерферон→пропранолол»; ^ - з групою «Інтерферон + пропранолол»; # - з групою «Пропранолол»; \$ - з групою «Пропранолол→інтерферон». Достовірність різниці -  $p \leq 0,05$

З’ясовано, що достовірно більш інтенсивне забарвлення було у мастоцитів, що містилися у зразках міокарду після перфузії розчином інтерферону- $\alpha 2b$ . Причому, перфузія неселективним блокатором  $\beta$ -адренорецепторів, та сполучення у перфузійному розчині обох препаратів не призводили до достовірного збільшення інтенсивності забарвлення. Лише за одним показником (максимальне значення сірих пікселів) ми зафіксували подібний ефект у мастоцитів після послідовної перфузії інтерфероном та пропранололом.

Насиченість забарвлення клітини специфічним відображенням інтенсивності синтезу прозапальних біологічно-активних речовин в

гранулах мастоцитів, збільшення їх кількості, а отже, показником ступеня їх активації.

Ступінь активації мастоцитів у міокарді під впливом перфузії різними поєднаннями інтерферону- $\alpha 2b$  та неселективного блокатора  $\beta$ -адренорецепторів дещо відрізнялася.

Так, розміри мастоцитів збільшувалися в ряду: “Інтерферон→пропранолол”, “Пропранолол”, “Інтерферон”, “Пропранолол→інтерферон”, “Інтерферон+пропранолол”, хоча достовірно більшими були лише площа та мала вісь клітин після перфузії розчином, що одночасно містив інтерферон та пропранолол, а також довшою була мала вісь клітин після перфузії розчином з пропранололом та інтерфероном.

Цікаво, що мастоцити після перфузії розчином з послідовним додаванням інтерферону та пропранололу були достовірно найбільш округлими, що, у поєднанні із меншими розмірами, може свідчити про низьку активацію (або відсутність такої).

Після порівняння показників інтенсивності забарвлення мастоцитів, у випадку пропускання через ізольоване серце розчинів із  $\beta$ -адреноблокатором пропранололом, було встановлено певні особливості. Зокрема показники, отримані після початкового пропускання розчину з інтерфероном та подальшого впливу пропранололу, меншою мірою відрізнялися від показників, отриманих під час перфузії інтерфероном.

Найбільше зниження інтенсивності забарвлення спостерігалось після початкової перфузії через серце пропранололом та подальшої – інтерфероном (також у порівнянні з перфузією лише інтерфероном).

Таким чином, додавання до перфузійного розчину неселективного  $\beta$ -адреноблокатору спричиняє зменшення вмісту біологічно-активних компонентів базофільних гранул мастоцитів, тим самим блокуючи стимулюючий вплив рекомбінантного інтерферону- $\alpha 2b$  на ці клітини.

### ВИСНОВКИ

В результаті проведеного дослідження встановлено “швидкий” ефект впливу рекомбінантного інтерферону на активність резидентних мастоцитів серцевого м’яза в умовах ішемії-реперфузії. Під час перфузії серця розчином інтерферону- $\alpha 2b$  відбувалася активація мастоцитів, розташованих у міокарді, що підтверджується збільшенням кількості секреторних базофільних гранул з біологічно-активним вмістом. Разом з тим, додавання до перфузійного розчину  $\beta$ -адреноблокатору призводить до нівелювання активуючого впливу інтерферону на мастоцити, знижуючи їхню прозапальну активність яка активується під час ішемії та дії високої концентрації інтерферону.

Доцільним є подальше вивчення швидких та віддалених ефектів впливу рекомбінантного інтерферону на активність резидентних мастоцитів серцевого м’яза в умовах ішемії-реперфузії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Арташян О. С. Изучение функциональной активности тучных клеток при иммобилизационном стрессе / О.С. Арташян, Б.Г. Юшков, Е.А. Мухлынина // Цитология. – 2006. – Т. 48. - №8. – С. 665-668.
2. Кондашевская М.В. Гепарин в защитно-приспособительных реакциях организма. [Обзор] / М.В.Кондашевская // Журн. Тромбоз, Гемостаз и Реология. – 2000. - № 3. – С. 26–28.
3. Colmchi F. Incidence of electrocardiographic abnormalities during treatment with human leukocyte interferon-alfa in patients with chronic hepatitis C but without preexisting cardiovascular disease. / F. Colmchi, S. Magnanimiti, F. Sebastiani, R. Silvestri, R.Magnanimiti // Current therapeutic research. – 1998. - №59 (10). – P. 692 – 696.
4. Floyd J.D. Cardiotoxicity of cancer therapy / J.D.Floyd, D.T.Nguyen, R.L.Lobins, Q.Bashir, D.C.Doll, P M.C.erry // J Clin Oncol. - 2005. - №23. - P.7685-7696.
5. Gutterman J.U. Recombinant leukocyte A interferon: Pbarmacokinetics, single-dose tolerance, and biologic effects in cancer patients / J.U.Gutterman, S.Fine, J.Quesada, et al. // Ann Intern Med. – 1982. - № 96. – P.549-556.
6. Hiramatsu S. Influence of interferon therapy on signal-averaged and ambulatory electrocardiograms in patients with chronic active hepatitis. / S.Hiramatsu, T.Maruyama, H.Ito, S.Shimoda, Y.Kaji, M.Harada // Int Heart J. 2005. - № 46 (6). – P. 1033-1040.
7. Indraccolo S. Identification of genes selectively regulated by IFNs in endothelial cells. / S. Indraccolo, U. Pfeffer, S. Minuzzo, G. Esposito, V. Roni, S. Mandruzzato, et el. // J. Immunol. – 2007. – 178. – P.1122-1135.
8. Ishikawa T. Inhibitory effects of interferon-gamma on the heterologous desensitization of beta-adrenoceptors by transforming growth factor-beta 1 in tracheal smooth muscle. / T.Ishikawa, H.Kume, M.Kondo, Y.Ito, K.Yamaki, K.Shimokata // Clin Exp Allergy. – 2003. - №33(6). – P.808-815.
9. Kaveti P. Cardiomyopathy due to pegylated interferon therapy for hepatitis C / P.Kaveti, E.T.Isom, K.Schrapp, M.Crawford // International J Intern Med. – 2014. – №3 (2). – P. 35-37.
10. Khaled A. Cardiotoxicity of cancer therapy / A.Khaled, M.D.Tolba, N.Efthymios, M.D.Deliargyris // Cancer Investigation. - 1999. - № 17(6). - P. 408-422.
11. Kovanen P.T. Mast cells in atherogenesis: actions and reactions. / P.T. Kovanen // Curr. Atheroscler. Rep. – 2009. - №11 (3). – P.214–219.
12. Le Corguille M. Complications cardiovasculaires de l’interferon-alpha. / M. Le Corguille, G.Pochmalicki, C.Eugene // Gastroenterol Clin Biol. - 2007.- №31. - P.1081-1084.
13. Marschall Z. Effects of interferon alpha on vascular endothelial growth factor gene transcription and tumor angiogenesis. / Z.Marschall, A.Scholz, T.Cramer, G.Schäfer, B.Wiedenmann, et al. // J Natl Cancer Inst. – 2003. - №95 (6). – P. 437-448.
14. Merigan T.C. Human interferon as a therapeutic agent / T.C. Merigan // N Engl J Med. - 1979. – 300. - P.42-43.
15. Quesada J. Clinical toxicity of interferons in cancer patients: A review. / J.Quesada, M.Talpaz, R.Rios, et al: // J Clin Oncol. - 1986. – № 4. – P.234-243.
16. Rechciński T. Cardiotoxic properties of interferon. / T.Rechciński, D.Matusik, T.Rudziński, Z.Bednarkiewicz, et al. // Pol Arch Med Wewn. – 2007. - №117 (1-2). – P. 49–52.

17. Reifenberg K. Interferon-induces chronic active myocarditis and cardiomyopathy in transgenic mice / K.Reifenberg, H.Lehr, M.Torzewski, G.Steige, E.Wiese, et al. // Am. J Pathology. – 2007. - №171 (2). – P. 463-472.
18. Salman H. The effect of interferon on mouse myocardial capillaries: an ultrastructural study / H.Salman, M.Bergman, H.Bessler, S.Alexandrova, M.Djaldetti // Cancer. – 1999. - №85(6). – P. 1375-1379.
19. Strander H.K. Clinical and laboratory investigations on man: Systemic administration of potent interferon to man. / H.K.Strander, K.Cantell, G.Carlstrom, et al. // J Natl Cancer Inst. - 1973. - № 51. - P.733-742.
20. Zbinden G. Effects of recombinant human alpha-interferon in a rodent cardiotoxicity model / G. Zbinden // Toxicology Letters. - 1990. - № 50. – P. 25-35.
21. Zheng L. Mechanisms for interferon- $\alpha$ -induced depression and neural stem cell dysfunction. / L Zheng, S. Hitoshi, N. Kaneko, K. Takao, T. Miyakawa, et al. // Stem Cell Reports. – 2014. - №3. – P. 73–84.

**Бесчасный С.П., Найдёнов М.Н., Гасюк Е.Н.  
РЕАКЦИЯ МАСТОЦИТОВ НА ПЕРФУЗИЮ СЕРДЦА РАСТВОРОМ  
ИНТЕРФЕРОНА**

*Ключевые слова:* рекомбинантный интерферон- $\alpha 2b$ ,  $\beta$ -адреноблокатор пропранолол, перфузия сердца.

В экспериментах на модели изолированного сердца мыши показано, что пропускание перфузионного раствора Кребса с препаратом рекомбинантного интерферона- $\alpha 2b$  приводит к возникновению «быстрого» эффекта активации резидентных тучных клеток, который проявляется увеличением их размеров, повышением внутриклеточного количества базофильных гранул с биологически активным содержимым. Вместе с тем, добавление к перфузионному раствору неселективного  $\beta$ -адреноблокатора пропранолола приводит к нивелированию активирующего влияния интерферона на мастоциты, снижая их провоспалительную активность, которая активируется в условиях ишемии и действия высокой концентрации интерферона.

**Beschasnyi S.P., Naydenov M.N. Gasiuk E.N.  
REACTION OF MASTOCYTES DURING PERFUSION OF HEART  
INTERFERON SOLUTION**

*Keywords:* recombinant interferon- $\alpha 2b$ ,  $\beta$ -blocker propranolol, the perfusion of the heart.

In model experiments on isolated mouse hearts showed that the transmittance of perfusion with Krebs solution preparation of the recombinant interferon- $\alpha 2b$  leads to a "fast" effect of activation of resident mast cells, which is shown enlarged, increasing the intracellular amount of basophilic granules with an active content. However, adding to the perfusion solution of the non-selective  $\beta$ -blocker propranolol results in a leveling of the activating effect of interferon on mast cells, reducing their pro-inflammatory activity, which is activated by ischemia and in conditions of high concentrations of interferon action.