

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет біології, географії і екології
Кафедра біології людини та імунології

ЦИТОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ ЛАБАРАТОРНИХ МИШЕЙ
В УМОВАХ ДІЇ ІНТЕРЛЕЙКІНУ-2

Кваліфікаційна робота (проект)
На здобуття ступеня вищої освіти «бакалавр»

Виконала: студентка 411 групи

Спеціальності: 091. Біологія

Освітньо-наукової програми: Біологія

Савченко Каріна Геннадіївна

Керівник: доц. Гасюк О.М.

Рецензент: доц. Карпукіна Ю.В.

ЗМІСТ

ВСТУП	3
РОЗДІЛ 1. Огляд літературних джерел	6
1.1. Історія відкриття інтерлейкіну-2	6
1.2. Структура інтерлейкіну-2 і його рецептори.....	8
1.3. Функції інтерлейкіну-2	10
РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи дослідження	19
2.1. Організація дослідження.....	19
2.2. Методи дослідження цитохімічних показників крові.....	20
2.2.1. Метод визначення мієлопероксидази.....	21
2.2.2. Метод визначення лужної фосфатази.....	22
2.2.3. Метод виявлення кислої фосфатази.....	23
РОЗДІЛ 3. Аналіз та обговорення отриманих результатів	29
3.1. Вміст мієлопероксидази у досліджуваних мишей.....	29
3.2. Вміст лужної фосфатази у досліджуваних мишей	32
3.3. Вміст кислої фосфатази у досліджуваних мишей	35
ВИСНОВКИ	39
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	40

ВСТУП

Актуальність теми. Протягом останніх 15 років активно вивчаються молекули, які утворюються клітинами для міжклітинного взаємозв'язку та взаєморегуляції їх діяльності. Такі молекули назвали цитокінами (cytos – клітина). Сьогодні під цитокінами розуміють велику кількість різноманітних біологічно активних молекул білкової природи, що секретуються клітинами імунної системи при запаленні, імунній відповіді, гомопоезі, тощо. Нині до системи цитокінів зараховують близько 200 поліпептидних речовин. Цитокіни беруть участь в ембріогенезі, процесі закладки та розвитку ряду органів, у тому числі й імунної системи.

Рівень цитокінів у плазмі крові відображає теперішній стан імунної системи організму. Індукована продукція цитокінів дозволяє оцінити потенціальні можливості активації клітин, що є важливим для оцінки стану імунної реактивності. Сьогодні для оцінки рівня цитокінів використовують різні твердо фазні імуноферментні методи.

Таким чином вивчення теми: «Цитохімічні показники крові лабораторних мишей в умовах дії інтерлейкіну 2 » є актуальним на даний час, так як ІЛ-2 приймає участь в проліферації та диференціюванні Т-лімфоцитів. Також інтерлейкін-2 бере участь в протипухлинному захисті. Він підвищує активність НК-клітин, індукує лімфокін-активованні кіллери.

Тому, цитокіни є важливим показником імунної системи. Вивчення рівня цитокінів у біологічних рідинах має важливе прогностичне значення для об'єктивного уявлення про стан імунної системи хворого, активність різних типів імунокомпетентних клітин, тяжкість запального процесу та його перехід у хронічну форму. Ось чому динамічне вивчення концентрації цитокінів може широко застосовуватися в практиці сучасної медицини.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження виконане в межах роботи над науково-дослідної ініціативною темою «Адаптаційні процеси організму в умовах цитокінового навантаження», номер державної реєстрації 0119U101093.

Мета дослідження. Дослідити окремі цитохімічні показники крові лабораторних мишей в умовах уведення інтерлейкіну-2.

Об'єкт дослідження. Біохімічні показники клітин периферичної крові лабораторних мишей.

Предмет дослідження. Зміни біохімічних показників клітин периферичної крові мишей в умовах впливу інтерлейкіну-2.

Завдання дослідження:

1. Зробити аналітичний огляд літературних джерел з тематики дослідження;
2. Визначити вміст мієлопероксидази в клітинах периферичної крові мишей досліджуваних груп;
3. Дослідити вміст лужної фосфатази в клітинах периферичної крові досліджуваних груп мишей;
4. Виявити вміст кислої фосфатази у крові досліджуваних тварин.

Методи дослідження. Експериментальне дослідження показників вмісту мієлопероксидази, лужної та кислої фосфатаз у клітинах периферичної крові лабораторних мишей виконано на базі лабораторії кровообігу та лабораторії молекулярної біології кафедри біології людини та імунології ХДУ. Використовувалися наступні методи: аналітичний огляд наукової літератури з тематики дослідження, біохімічні методи, методи математичної статистики.

Практична новизна. Отримані експериментальні відомості доцільно застосувати у освітньому процесі Херсонського державного університету при викладання курсів «Клітинні основи кровотворення та Імунологія». Також матеріали кваліфікаційної роботи доцільно

використовувати у шкільному курсі біології 8 класу в темі «Імунна регуляція».

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

Структура роботи. Робота складається із вступу, огляду літературних джерел, опису матеріалів і методів дослідження, аналізу та обговорення отриманих результатів, висновків та списку використаних джерел із 42 найменування.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1.1. Історія відкриття інтерлейкіну-2

А. Ісакі та Ліндеман в 1957 році вперше повідомили що, інтерферон є антивірусним агентом, продукується клітинами у відповідь на впровадження вірусу. Природними медіаторами є цитокіни, саме вони є посередниками міжклітинних взаємодій в ході імунної відповіді.

Ці речовин, що виробляються активованими клітинами імунної системи в результаті впливу на них антигенів, мітогенів, антитіл до поверхневих білкових молекул лімфоцитів, речовин хімічної природи. Молекулярна маса більшості цитокінів складають 15-40 кДа.

Також вважалось, що дія цитокінів регулюється при близькому контакті клітин в ділянці імунного процесу. Більшість з них має високу швидкість напіврозпаду, наприклад, для ІЛ-2 вона дорівнює від 2 до 20 хвилин. Однак в останні роки доведено присутність ряду цитокінів в циркуляції і, таким чином, можливість їх системної дії. Більше трьох десятків цитокінів були очищені до гомогенного стану, встановлені їх первинні структури, виділені і клоновані які кодують їх гени, розшифрована структура їх рецепторів. Велика кількість цитокінів стала доступною для біологічних і клінічних досліджень. Було доведено, що цитокіни діють каскадно через специфічні рецептори-глікопротеїни на мембранах активованих клітин. До основних класів цитокінів відносяться інтерлейкіни, інтерферони, цитотоксичні фактори, гемопоетичні чинники, хемокіни і ряд інших.[1]

З початку 80-х років ХХ століття дослідження, присвячені виявленню ролі цитокінів в патогенезі різних захворювань, розвивалися стрімко і знаходилися в центрі уваги фундаментальної і клінічної

імунології та пов'язаних з нею медичних дисциплін. В цей же період були розпочаті широко масштабні клінічні дослідження перших рекомбінантних препаратів цитокінів.

Стрімко зростаюча популярність цитокінових препаратів в клінічній імунології не є випадковою. Цитокіни є природними і необхідними компонентами, що забезпечують координовану роботу імунної системи і її взаємодія з іншими органами і системами макроорганізму. Механізми цитокінової регуляції виникли дуже давно в процесі еволюції, і можна припустити, що ніякі штучно створені імунно-модулятори, невідповідні природним факторам, не здатні повноцінно замінити або відтворити їх функції. Знання імунобіологічної ролі ендогенних цитокінів полегшує розуміння імунно-терапевтичних ефектів рекомбінантних цитокінових препаратів і пояснює швидке впровадження їх в клінічну практику.[3]

Одними з перших цитокінових імуномодуляторів після інтерферонів отримали визнання препарати на основі рекомбінантного інтерлейкіну-2. Інтерлейкін-2 з'явився історично першим цитокіном, який був ідентифікований і описаний на молекулярному рівні. Відкриття ІЛ-2 в імунній системі людини було пов'язано з його здатністю тривалий час підтримувати проліферацію лімфоцитів. Завдяки своїм мітогенним властивостям в ранніх дослідженнях різних авторів, ІЛ-2 називався фактором зростання лімфоцитів і мав велику кількість синонімів. Така ситуація зберігалася до прийняття міжнародним співтовариством єдиної класифікації цитокінів.[2].[4]

У 1979 році на конференції в Швейцарії була запропонована номенклатура імунних медіаторів, і для позначення молекул, що передають сигнальну інформацію між лейкоцитами, введено термін «інтерлейкін». Молекула, яка проявляє активність ІЛ-2, було вперше дано в журналі *Molecular Immunology* в 1981 році. Хронологія вивчення ІЛ-2 умовно включає 3 фази: спочатку детальна

характеристика біологічної активності молекули, в подальшому дослідження біохімічної будови молекули і в завершенні ідентифікація структури гена ІЛ-2.

У 80-х роках вивченням біологічної ролі цитокінів були зроблені спроби по створенню на їх основі лікувальних препаратів. Одним з перших в клінічній практиці отримав визнання рекомбінантний інтерлейкін-2 - rIL-2. До сих пір в світі найбільш ефективним методом лікування нирково-клітинного раку вважається імунотерапія з використанням препаратів rIL-2.[6]

Важливо відзначити, що вітчизняний ІЛ-2 перевершує по ряду показників зарубіжні аналогіі rIL-2, які створені на основі бактеріального продуцента *E.coli*, відрізняються від ендогенного ІЛ-2 по амінокислотній послідовності (тобто є білками мутантами) і характеризуються наявністю великої кількості побічних ефектів, що значно обмежує їх клінічне застосування. Рекомбінантний ІЛ-2 людини ідентичний по амінокислотній послідовності пептидного фрагменту ендогенного людського ІЛ-2 і добре переноситься пацієнтами, практично не володіючи побічними ефектами.[5].

1.2. Структура ІЛ-2 і його рецептори

ІЛ-2 являє собою типовий чотирьох- α -спіральний цитокін, який жорстко регулюється на рівні мРНК за допомогою сигналів від Т-клітинного рецептора і CD28. ІЛ-2 зв'язується з клітиною через рецепторний комплекс, що складається з трьох субодиниць: ІЛ-2R α (CD25), ІЛ-2R β (CD122) і загальної γ -ланцюга (CD132). Тільки частина залишку ІЛ-2 взаємодіють як з ланцюгами β , так і зв'язування ІЛ-2 може індукувати конформаційні зміни в β -ланцюга, що сприятиме подальшому залученню ланцюга γ . Для сигналізації необхідні ланцюжки β і γ , так як α -ланцюг не бере участі в передачі сигналів.

Структура ІЛ-2 і його рецептора є гнучкою і може природним чином існувати в різних конформаціях, які утворюють проміжний афінний ІЛ-2R, що призводить до активації імунних клітин.(рис.1.1) [11].

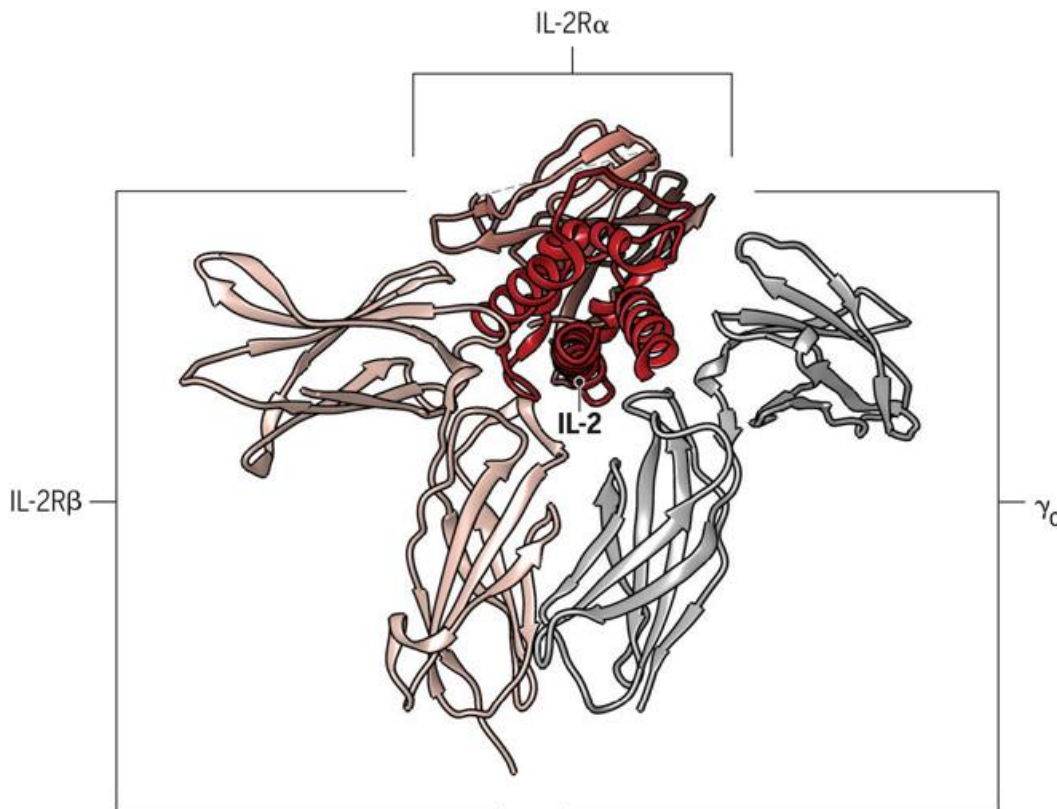


Рис. 1.1. Структура комплексу ІЛ-2 / ІЛ-2R.

Дослідження в галузі генетики як науки вказують на вирішальну роль порушень регуляції ІЛ-2 як фактора ризику аутоімунних захворювань. Рідкісні мутації, що порушують аутокринний механізм регуляції ІЛ-2, можуть викликати важкі форми імунної дисрегуляції. Дефіцит ІЛ-2R α призводить до хронічного імунодефіциту і розвитку ІРЕХ-синдрому (імуннодисрегуляція, поліендокрінопатія, ентеропатія і Х-пов'язаний синдром) - варіабельними аутоімунними реакціями, що розвиваються в перший рік життя і зумовленими мутацією транскрипційного активатора FOXP3. У локусі гена ІЛ2R α одно нуклеотидний поліморфізм (ОНП, SNP) впливає на рівні транскрипту ІЛ2R α , розчинність рецептора ІЛ2R α , його експресію на специфічні

для нього типи імунних клітин і поширеність, експресують IL2RA T-клітин в крові. [8]

Нещодавно розроблене витончене картування генів (*fine mapping*) вказує на потенційні ОНП з поліпшеною роздільною здатністю. Як значимого прикладу, в локусі IL-2RA був відображений один некодуючий варіант ОНП в першому інтроні, асоційований з ризиком хвороби Крона. Парадоксально, але той же ОНП якимось чином пов'язаний із захистом від цукрового діабету 1 типу, що узгоджується з ситуаційно обмеженими ефектами ІЛ-2, що надають дисонансний вплив на два різних захворювання.[9]. [12].

Регулярно згруповані короткі поліндромні повтори (CRISPR) продемонстрували, що витончено картирований IL-2RA варіант з ризиком аутоімунізації знижує час індукції IL-2RA в називних T-клітинах при стимуляції. У майбутньому такі роботи будуть мати потенціал як відкриття зміни у відповідь на стимуляцію в індукції IL-2RA може змінювати ризик розвитку таких захворювань, як хвороба Крона і цукровий діабет 1 типу. Селективна генна інженерія може бути використана для визначення цих пов'язаних із захворюванням варіантів, для оцінки механістичного впливу на регуляцію IL-2RA і створення лікарського засобу майбутнього, що працює безпосередньо щодо порушених клітинних реакцій. Крім того, CRISPR дає можливість «коригувати» серйозні мутації, які порушують сигналізацію ІЛ-2 або переписувати послідовності кодують генів, що контролюють специфічну регуляцію сигнальних компонентів ІЛ-2 для генної інженерії в терапії майбутнього.[7]

1.3 Функції інтерлейкіну-2

ІЛ-2 необхідний для виживання супресивних функцій регуляторних Т-клітин (які визначаються як CD4 +, Foxp3 +, CD25 +, CD127), а відсутність ІЛ-2 або порушення його зв'язку з рецептором проявляється чисельним або функціональним дефіцитом регуляторних Т-клітин, що є причиною аутоімунних реакцій. Багато експериментальних підходів показали, що цей цитокін має вирішальне значення для підтримки функціонування клітин Treg: за відсутності ІЛ-2 Т-супресори зникають з периферичних лімфоїдних органів, мабуть, тому, що дефіцит цього фактора росту призводить до загибелі клітин. роль ІЛ-2 у виживанні регуляторних Т-клітин, його необхідність для реалізації функціональної потужності клітин Treg. Він необхідний для експресії Foxp3 та інших медіаторів Treg, що пригнічують клітинну активність. Стабільна експресія Foxp3 реалізується за рахунок зв'язку з його промотором ІЛ-2-індукованого транскрипційного фактора Stat5. Обмежена доступність ІЛ-2 в тканинах, які зазнали локального запалення, може привести до нестабільності клітин Treg, втрати експресії Foxp3 і подальшого виробництва патогенних цитокінів ефекторними клітинами, які можуть погіршити аутоімунізації.[10].[13]

Зрілі клітини Treg не виробляють ІЛ-2, а він, імовірно, функціонує аутокринно, невідомий був джерелом цитокіна, який підтримує на периферії регуляторні Т-клітини. Передбачалося, що стандартні (Foxp3-) Т-клітини продукують ІЛ-2, який потім діє на Т-супресори. Ця теорія була підтверджена дослідженнями, проведеними в умовах внутрішньої видової візуалізації і показали, що регуляторні та стандартні Т-клітини локалізуються разом з антиген дендритними клітинами, і в цих трьохклітинних кластерах стандартні клітини реагують на антиген шляхом секреції ІЛ-2, тоді як клітини Treg цей цитокін приймають. встановлено, що ІЛ-2 служить, мабуть, обидва завданням: як стимуляції імунної відповіді, так і його контролю і

стримування (мал.2). Цікаве питання про те, за яких обставин ця функція домінує. Одне з припущень полягає в тому, що домінуюча функція визначається кількістю і кінетикою продукції ІЛ-2: індукція ефекторних клітин у відповідь на короткочасний вплив високих доз цитокину і регуляторних клітин у відповідь на стійкий зміст низького рівня цитокінів. На активацію різних популяцій Т-клітин також впливає кінетика експресії інтерлейкінових рецепторів. Рецептор поглинається клітиною після зв'язування з цитокіном, а невеликий пул внутрішньоклітинного ІЛ-2R β стандартних CD4 + Т-клітин не дозволяє їм підтримувати їх тривалу експресію. Регуляторні Т-клітини, навпаки, мають великі внутрішньоклітинні пули рецепторних ланцюгів, завдяки чому здатні здійснювати їх експресію і протягом тривалого часу можуть представляти більш стійке виділення ІЛ-2, ніж інші популяції Т-клітин.[17]

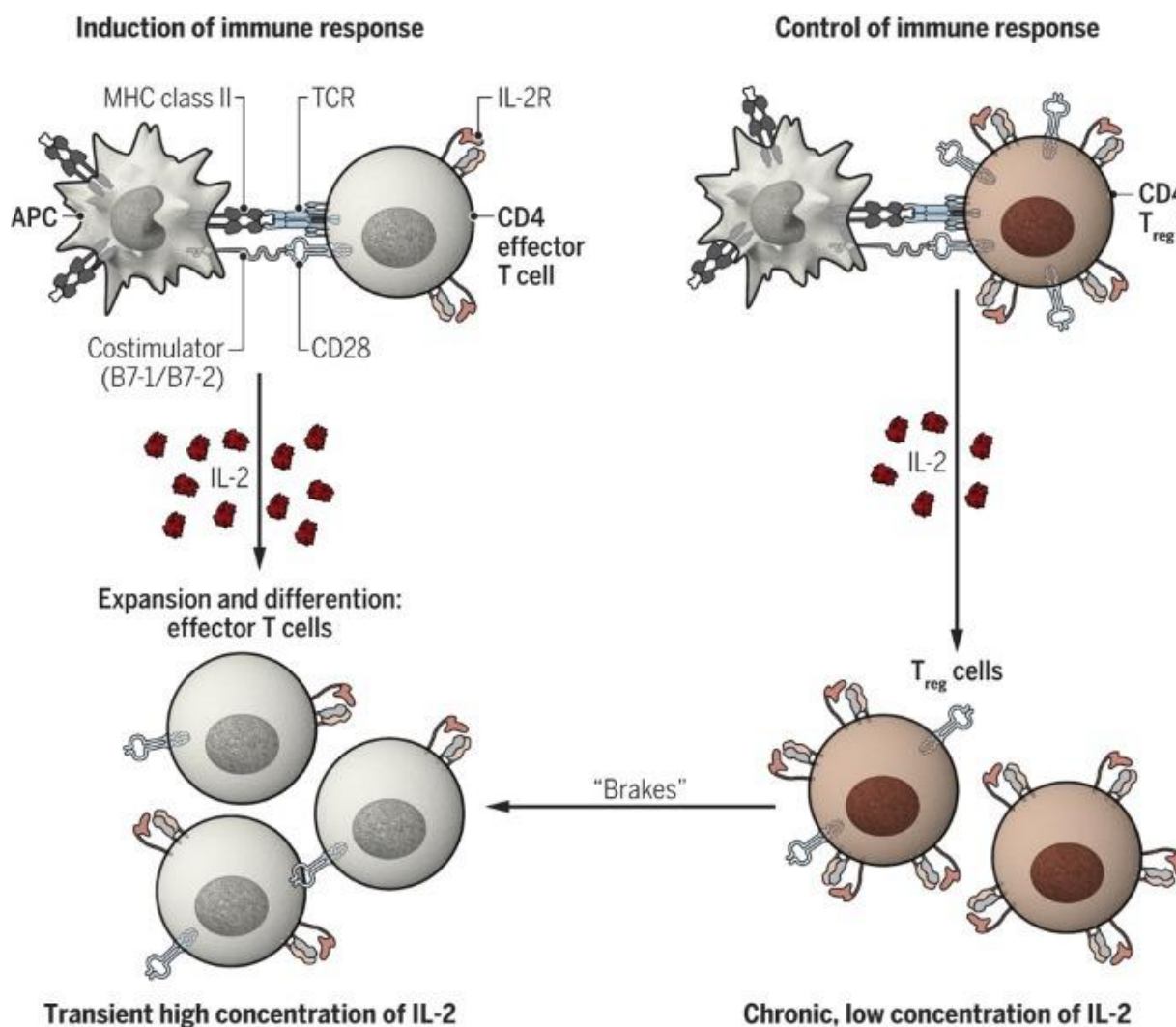


рис. 2. Подвійна роль ІЛ-2 в активації Т-клітин.

ІЛ-2 бере участь в індукції імунних реакцій шляхом стимуляції проліферації і диференціювання «звичайних» Т-клітин і контролю імунних реакцій за рахунок підтримки функції регуляторних Т-клітин. Ця двоїста активність, імовірно, розрізняється по кінетиці і кількості виробленого ІЛ-2.

Слід згадати, що ІЛ-2 здійснює важливі функції по відношенню до інших клітин лімфоїдного ряду, включаючи НК-клітини і лімфоїдні клітини вродженого імунної відповіді (рис.2). В одних випадках ІЛ-2 може збільшувати підмножина CD56 + НК-клітин, які вважаються популяцією пухлин, в інших сприяє проліферації лімфоїдних клітин вродженої імунної відповіді (ILC2), що сприяє продукції ІЛ-5, що, в свою чергу, призводить до еозинофілії і альтернативної активації

макрофіт. Крім того, ІЛ-2 контролює і інші містять CD25 + клітини, необхідні для підтримки тканинного гомеостазу.(рис..3)[15] [6]

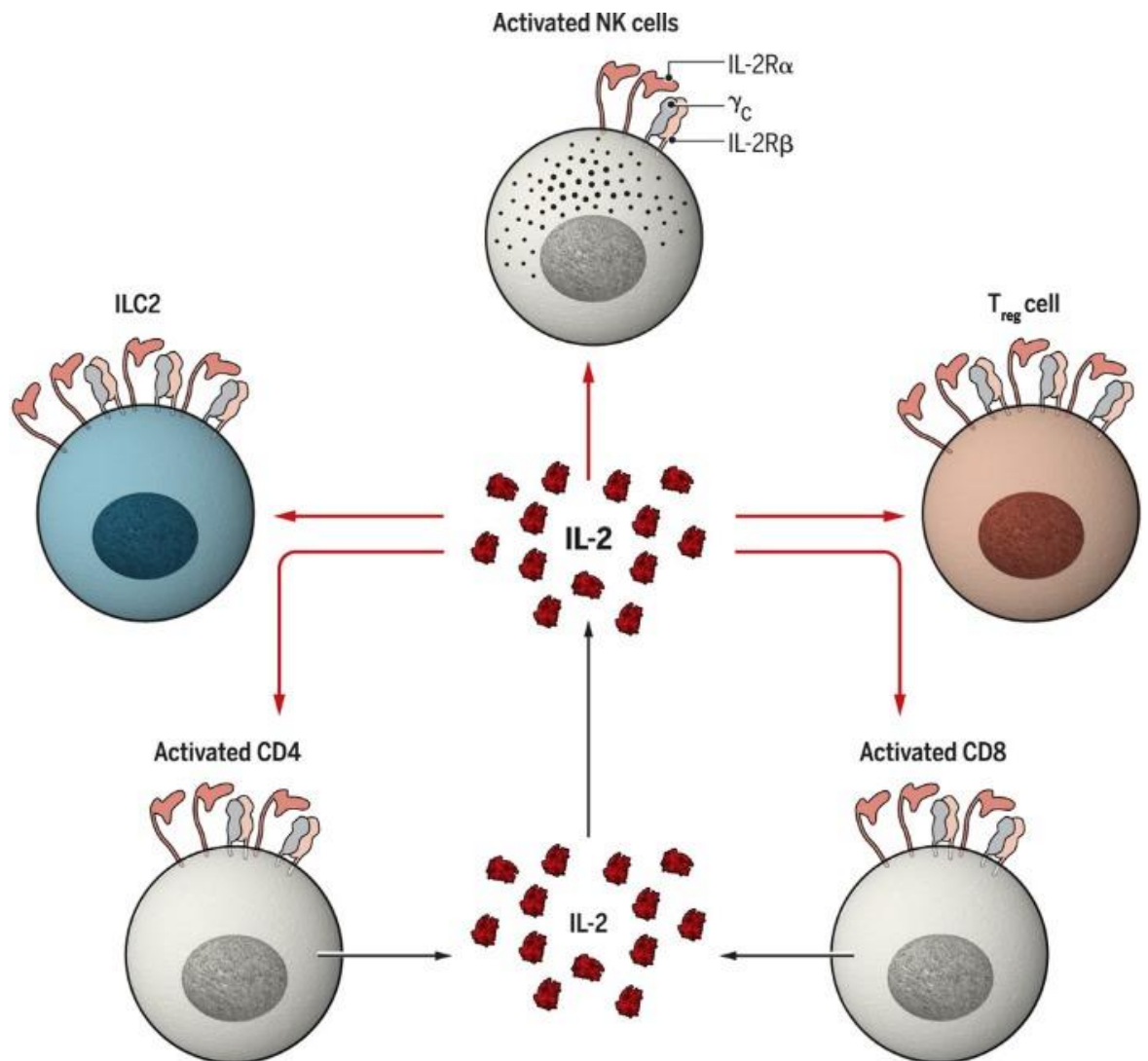


рис.3 Мішені дії ІЛ-2.

З'ясування ролі ІЛ-2 для регуляторних Т-клітин передбачало можливість використання цитокіна для боротьби з небажаною імунною відповіддю, а також в лікуванні аутоімунних і запальних захворювання. Завдання використанню ІЛ-2 для придушення патологічних імунних реакцій полягає в тому, що цитокіни можуть активувати ефektorну гілку клітин лімфоїдного ряду, тим самим знижуючи ризик загострення хвороби. Розробляється кілька підходів для таргетування ІЛ-2 на регуляторні клітини.[14]

Зі зміною структури ІЛ-2 є створення антитіл до нього, які при утворенні комплексів з цитокіном можуть стимулювати експресію

регуляторних або ефекторних Т-клітин. Цей підхід був запропонований після виявлення здатності цитокіна зв'язуватися з різними ІЛ-2-антитілами, що блокують на цитокінів сайти для зв'язку з β -ланцюгом рецептора і індукують ефект, змінює зв'язування ланцюга ІЛ-2R α . Експериментально розроблено ІЛ-2-антитіла JES6-1, стерично блокують взаємодію ІЛ-2 / ІЛ-2R β і ІЛ-2 / ІЛ-2R γ , індукуючи переважну активацію клітин ІЛ-2R α . Інші антитіла до ІЛ-2, S4B6, навпаки, змінюють його конформацію приводячи до блокування взаємодії ІЛ-2 / ІЛ-2R α і стабілізації взаємодії ІЛ-2 / ІЛ-2R β , що приводить до виборчого таргетування ефекторних Т-клітин.[18]

Ці результати були відтворені шляхом розробки моноклональних антитіл до ІЛ-2, які, зв'язуючись цитокіном, призводять до його конформаційних змін, які вимагають як більшою експресії CD25, так і меншого порога для прискорення проліферації, що реалізує посилення активації і збільшення пулу клітин Treg.. Було показано, що ці антитіла - комплекси ІЛ-2 ефективні в моделях таких аутоімунних захворювань, як цукровий діабет 1 типу та експериментальний аутоімунний енцефаломієліт, а також в моделі РТПХ (реакція «трансплантат проти господаря»). Розробка таких препаратів для клінічного застосування може бути поліпшена шляхом безпосереднього зв'язування антитіла з ІЛ-2, в результаті чого утворюється єдиний агент, який може збільшувати період напіввиведення ІЛ-2 і в той же час обмежувати його нецільову токсичність.[16]

До підвищення ефективності ІЛ-2 складаються в з'єднанні цитокіна з великими молекулами переносниками, такими як альбумін або поліетилен - гліколь (ПЕГ), або з генетичним злиттям ІЛ-2 з Fc (кристалізується фрагмент) імуноглобуліну. В даний час ведеться розробка ПЕГілірованого ІЛ-2 від Nektar Therapeutics зі зниженою афінності до тримірного ІЛ-2R регуляторних Т-клітин, який більшою

мірою підтримує цитотоксичні CD8 + клітини, забезпечуючи виражену протипухлинну активність.[19]

Інтерлейкін-2 застосовується в медицині, зокрема в галузі інфекційних захворювань. Найбільш популярними є такі захворювання як:

- Герпес-вірусні інфекції;
- Вірусні гепатити;
- Гнійний синусит і тд.

Терапія Ронколейкіном ефективна при рецидивуючому простому герпесі, генітальний герпес, генералізованому герпесі, герпес 6 типу, генералізованих, бульозних і пустульозних формах вітряної віспи, цитомегаловірусної інфекції. Застосування Ронколейкіна дозволяє подолати характерну для герпетичної інфекції тенденцію до лейкопенії або лимфопенії. Також терапія Ронколейкіном сприяє збільшенню кількості NK-клітин і CD8 лімфоцитів. Клінічно ефективність Ронколейкіна проявляється достовірним скороченням термінів захворювання, подовженням безрецидивного періоду 2 рази (в порівнянні з контролем) і полегшенням перебігу рецидивов. Після терапії Ронколейкіном вродженої цитомегаловірусної інфекції спостерігали пригнічення реплікації цитомегаловірусу в крові (за результатами ПЛР) у дітей у віці від 1,2 міс. до 1 року. Клінічно після проведеного лікування відзначена позитивна динаміка в неврологічному статусі, зареєстровано зменшення гепатомегалії і спленомегалії. Сумарно достовірний клінічний ефект досягнутий у 73% пацієнтів.[23]

Лідуюча роль в групі гемоконтактних гепатитів відводиться вірусних гепатитів В, С і мікст-гепатиту В + С, які характеризують-ся високим ризиком хронізації, можливістю розвитку цирозу пе-чені і гепатоцелюлярної карциноми. Питання етіотропної терапії вірусних гепатитів у дітей складні і вимагають обліку віку дитини,

преморбідного фону, супутніх хронічних захворювань, оцінки вірусологічної та біохімічної активності процесу, а при HCV-інфекції-визначення генотипу вірусного штаму. У світовій практиці найбільш ефективним вважається поєднання препаратів $\alpha 2$ -інтерферону з противірусними засобами. Однак їх трансформаційні зміни не завжди можливі через існуючі протипоказання. Крім того, при використанні цієї терапії у дітей часто відзначаються небажані ефекти, особливо при тривалому застосуванні.[21]

При хронічному гепатиті С відбувається системне і місцеве підвищення рівнів прозапальних цитокінів (IL-1, TNF- α); виникає функціональний дисбаланс системи цитокінової регуляції. В цьому випадку перспективним може бути застосування регуляторних цитокінів, зокрема, рекомбінантного інтерлейкіну-2. [22]

Вперше застосовувати Ронколейкін в терапії в 1998 році почали співробітники кафедри інфекційних хвороб Санкт-Петербурзької державної педіатричної медичної академії. Досвід застосування Ронко-Лейкіна в терапії хронічних гепатитів у дорослих показав, що лікування Ронко-Лейкін хворих призводило до відновлення показників клітинної ланки імунітету, імунорегуляторного індексу, збільшення функціональної активності нейтрофілів і моноцитів, нормалізації змісту в сироватці крові імуноглобулінів основних класів, зниження рівнів TNF- α , IL-1 β і IL-4 на тлі збільшення вмісту IFN- γ і IL-2 в сироватці крові.[20].

Лікування дітей від 3-х до 16 років з прогресивним перебігом ВГВ, ВГС і мікст-гепатити (В + С) показав, що монотерапія Ронколейкіном протягом 8 тижнів призводить до повної первинної ремісії у 100% дітей хворих на ВГВ, у 60% - мікст-гепатити. У хворих ВГС первинна біохімічна ремісія склала 85%, первинна вірусологічна ремісія- 78% . Через 6 місяців повна стабільна ремісія виявлена у 90%

дітей з ВГВ, 50% - мікст-гепатити. У хворих ВГС стабільна біохімічна ремісія склала 75%, стабільна вірусологічна ремісія- 70%.

Гнійний синусит

Монотерапія Ронколейкіном знижує ризик розвитку ускладнень і прискорює терміни очищення пазух. Повне очищення пазух настає на 2-4 добу від початку лікування. Застосування Ронколейкіна в режимі монотерапії дозволяє домогтися клінічно значущого ефекту при неефективності або непереносимості антибіотиків і антисептиків, а також у тривало і часто хворіючих пацієнтів.[11].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Організація дослідження

Для даного дослідження використовували білих безпородних статевозрілих самців-мишей. Під час роботи дотримувалися загальних етичних принципів по догляду та використанню лабораторних тварин: «Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 2005), «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах», прийняті V національним конгресом з біоетики (Київ, 2013). Протягом 6 тижнів відбувалося дане дослідження. Сформувалося 5 дослідних груп (n=90). Тваринам I групи вводився інгібітор ІЛ-2 (Сандиммун Неорал Циклоспорин) перорально по 0,4 мл (концентрація 10 мг/кг). II, III та IV дослідним групам підшкірно вводили препарат ІЛ-2 (Ронколейкін, ПАТ «Біотех») по 0,2 мл у концентраціях 5000 МО/кг, 7500 МО/кг та 30000 МО/кг відповідно. V групі тварин фізіологічний розчин вводили підшкірно. Вводили препарати 3 рази на тиждень, перед кожним тренуванням. Через 4 тижні перерву зробили на 14 днів. Після чого на 6 тижні провели контроль післядії препарату.

Для оцінювання адаптивного впливу на загальну фізичну працездатність тварин, кожного дня через 1 годину після введення препарату та зважування, застосовували метод примусового плавання до повного виснаження з вантажем (7,5% від маси тіла). Це середній аеробно-анаеробний рівень навантаження [14].

Мишей поміщали в циліндр (h = 30 см, d=30 см), наповнений теплою водою (t=25±1°C), де миші плавали до повного виснаження. Закрплювали вантаж в області міжребер'я стягуючою гумовою

стрічкою. Критерієм виснаження були 3 без успішні спроби всплти на поверхню або відмова і опускання на дно. Після цього тварину швидко діставали з води, знімали вантаж та обсушували сухим рушником. Фізичну працездатність вимірювали за часом тривалості плавання мишей від моменту потрапляння у воду до повного виснаження – занурення на дно. [42].

На початку експерименту було проведено попереднє тестування плавання (протягом 1 тижня) – для визначення орієнтовного часу працездатності з певним вантажем. Потім експериментальне дослідження показників фізичної працездатності тварин умовно поділили на періоди для визначення адаптаційних змін (контроль, 2, 4, 6 тижнів). За контроль були взяті показники плавання в 1 день тренувань, а для визначення післядії препаратів – останній день 6 тижня експерименту.

Загальна частина експерименту проводились спільно із аспіранткою кафедри біології людини та імунології Швець В.А. та із студенткою Андрієвською М.Р.

2.2. Методи дослідження цитохімічних показників крові.

Для визначення ефекторних впливів аутоімунних процесів на метаболічну активність гранулоцитів периферичної крові, проводили дослідження вмісту в них мієлопероксидази, катіонних білків, ліпідів та лужної фосфатази. Для вирішення поставленої задачі застосовували цитохімічні методи дослідження, засновані на використанні специфічних хімічних реакцій для ідентифікації та визначення кількості досліджуваних речовин у клітинах [35].

Показник інтенсивності реакції виражали за допомогою принципу Astaldi заснованого на оцінці інтенсивності специфічної цитохімічної

реакції із використанням чотирьохбальної шкали [33].

Відповідно, методика оцінки всіх цитохімічних реакцій була наступною: використовуючи імерсійну систему мікроскопу підраховували по 100 елементів кожної групи і у кожній з клітин визначали ступінь інтенсивності забарвлення. При відсутності забарвлення – реакцію вважали негативною (0). За наявності в цитоплазмі одинарних гранул продукту реакції (до 30-ти) або її слабке дифузне забарвлення, позначали як реакцію 1-го ступеню (+). За умов реакції 2-го ступеню, продукт досліджуваної речовини або ензиму має заповнювати майже всю цитоплазму (до 60 гранул) і відповідає оцінці (++) . До 3-го ступеню відносили клітини з високим вмістом продукту реакції, коли велика кількість дрібних, інтенсивно забарвлених гранул, заповнювала всю цитоплазму.

Число клітин з однаковим ступенем інтенсивності забарвлення множили на відповідну даній групі кількість плюсів. Сума цих значень поділена на 100 представляла собою середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК):

$$СЦК = \frac{0+1a+2b+3c}{100} .$$

Де цифри 0, 1, 2, 3 – ступені інтенсивності забарвлення; букви – число клітин з тією чи іншою інтенсивністю забарвлення; 100 – кількість підрахованих клітин.

Таким чином, клітини з негативною реакцією виключалися з підрахунку при визначенні показника СЦК.

2.3. Методика виявлення лужної фосфатази у лейкоцитах периферичної крові

Для *дослідження лужної фосфатази* використовували метод азосполучення по Kerloy [17]. Метод заснований на явищі

розщеплення лужною фосфатазою α -нафтил-фосфату (фосфорний ефір α -нафтолу) з вивільненням α -нафтолу, який вступає у реакцію азосполучення з сіллю діазонію. В результаті у місцях активності ферменту випадає осад азобарвника (коричневий осад).

Для проведення дослідження використовували наступні реактиви:

1. 10% розчин формальдегіду в абсолютному метанолі;
2. 0,05 М розчин пропандіолового буферу (рН 9,75). Перед проведенням дослідження готували основний 0,2 М розчин (10,5 г 2-аміно-2-метил-1,3-пропандіолу розчиняли у 500 мл дистильованої води). З основного розчину готували 0,05 М розчин (25 мл основного розчину буфера змішували з 5 мл 0,1 н. розчину HCL і доводили дистильованою водою до 1000 мл);
3. α -нафтил-фосфат;
4. Міцний синій RR;
5. 2% розчин метилового зеленого;
6. Інкубаційне середовище (готували безпосередньо перед використанням): 35 мг α -нафтил-фосфату, 35 мг міцного синього RR, 35 мл буферного розчину [14].

Хід визначення. Висохлі на повітрі мазки фіксували у 10% розчині формаліну в абсолютному метанолі при температурі 0-5 °С протягом 30 с. Після фіксації наносили інкубаційне середовище і залишали при кімнатній температурі на 8-10 хв. Споліскували у проточній воді 10 с. Дофарбовували метиловим зеленим протягом 15 хв. [17]

2.4. Методика виявлення кислої фосфатази у лейкоцитах периферичної крові

Спосіб визначення активності кислої фосфатази в мазках крові, що включає підготовку та фіксацію біологічного субстрату, обробку

його буферно-інкубаційної сумішшю, інкубацію біологічного субстрату з подальшим висушуванням і мікрокопіюванням, як біологічного субстрату використовують мазки крові, для приготування буферної суміші використовують 0,2 М розчин бурштинової кислоти, додають 12-13 мг ЕДТА (етилендіамінтетраоцтова кислота) та 0,2 М NaOH, доводять рН до 4,9-5,1, а потім в інкубаційну суміш додають 0,6612 мл буферної суміші для забезпечення рН 5,0. При цьому інкубацію проводять у темряві 2 години при $t=37^{\circ}\text{C}$, промивають дистильованою водою, висушують, додатково фарбують мазки крїй, висушують і за кількістю пофарбованих гранул червоно-коричневого кольору в цитоплазмі нейтрофілів визначають відсоток активності ферменту кислої фосфатази [17].

Фіксацію мазків здійснюють в парах 40% формаліну 1-3 хвилини, а для приготування інкубаційної суміші використовують- α - нафтилфосфат натрію, в кількості 2,0 мг розчиняють в 1,3 мл дистильованої води з додаванням 0,6512 мл буферної суміші невеликими порціями, помішуючи, потім беруть 5-6 мг барвника нейтрального міцного синього і розчиняють його в 2,5 мл буферної суміші, змішуючи їх поступово (рН 5,0), отримані розчини змішують, фільтрують у темряві через скляний фільтр [25].

Застосування методики засноване на взаємодії кислої фосфатази з α -нафтилфосфатом натрію. Фосфатаза каталізує гідроліз α -нафтилфосфата натрію з утворенням α -нафтола і фосфорнокислого двозаміщеного натрію. Для активації кислої фосфатази в систему вводили буферну суміш, запропоновану нами, що складається з бурштинової кислоти ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ молекулярною масою $M=176,09$) - є природним субстратом клітинних ферментів, бере участь в основному при внутрішньоклітинному диханні в синтезі АТФ, а фосфатази каталізують процеси з участю АТФ. В буферну суміш входив 0,2 М

розчин NaOH, а також трилон Б (ЕДТА), який інгібує лужну фосфатазу. Потім α -нафтол взаємодіє з барвником - нейтральним міцним синім В з утворенням комплексної сполуки азокрасителя. Утворився комплекс (азобарвник) забарвлює кислу фосфатазу, що міститься всередині вид активного розщеплення) - гідролізу α -нафтилфосфата з участю ферменту кислої фосфатази (3.1.3.2) з класу 3-гідролаз (Рис. 2.2) :

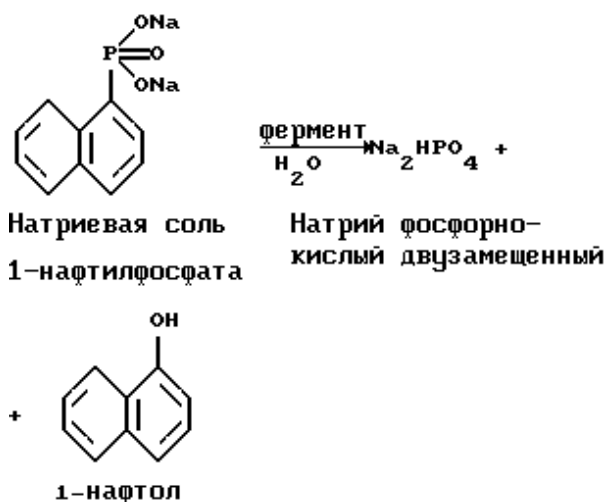


Рис. 2.2. Комплекс (азобарвник) забарвлює кислу фосфатазу [27].

2) Вторинна реакція (реакція сполучення) тобто взаємодії 1-нафтола з нейтральним міцним синім (Рис. 2.3):

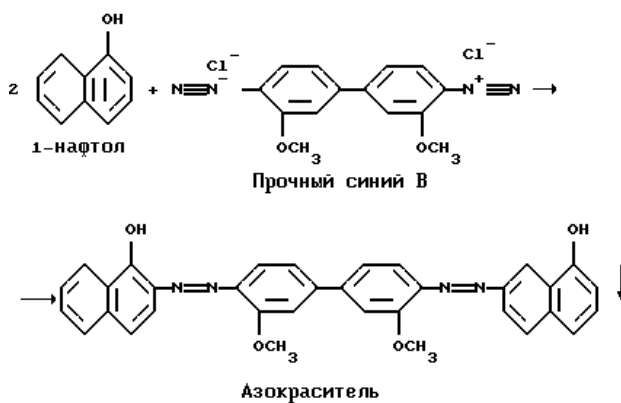


Рис. 2.3. Взаємодії 1-нафтола з нейтральним міцним синім [25].

Запропонований спосіб показує безпосередній зміст досліджуваного ферменту в нейтрофільних гранулоцитах і можливість оцінки цитохімічної реакції, що неможливо визначити в сироватці крові. В мазку визначаються стан мікробіцидних систем крові, беруть участь у формуванні неспецифічної резистентності організму. Визначається активність кислої фосфатази в клітинах крові по чотирьох рівнях.

Суть винаходу пояснюється кресленням, де представлена мікроскопія за ступенями активності ферментів, локалізованих в нейтрофілах [24].

Приклад конкретного здійснення способу визначення активності кислої фосфатази в мазках крові.

Краплю крові наносили на край сухого знежиреного скла, яке утримували між великим і середнім пальцями лівої руки. Рухом правої руки від себе краплю розподіляємо тонким шаром по предметному склу. Хорошим мазком буде такий, у якому кров розташовується на поверхні скла без просвітів, у вигляді рівномірної смужки, не виходить за її краї. Мазки висушують на повітрі і фіксують в парях 40% формаліну протягом 3-4 хвилин. Для цього на дно эксикатора наливають близько 150 мл формаліну, залишають під закритою кришкою на 30 хвилин для сублімації пари формаліну. Потім обережно знімають кришку і на решітку эксикатора поміщають мазки і закривають кришкою. Таким чином, мазки фіксуються [25],[18]

Приготування буферних розчинів. Спочатку проводили калібрування йономеру рН - 150. До складу буферної суміші входили 0,2 М розчин бурштинової кислоти (з молекулярною масою 118,09), з якого готували розчин - А, для цього брали 2,362 г бурштинової кислоти і розчиняли у дистильованій воді в обсязі 100 мл; потім готували розчин - Б, що складається з 0,2 М NaOH (молекулярною

масою 36,465); Потім 25 мл розчину А - (янтарної кислоти), додавали 12 мг ЕДТА і розчином Б - 0,2М NaOH 32 мл доводили рН до 5,0. Дуже важливо підібрати буферну суміш для отримання рН 5,0, а також здатності складу буферної суміші активувати фермент - кислу фосфатазу.

Приготування інкубаційної суміші.

Правильне приготування інкубаційної суміші має важливе значення для подальшого фарбування мазків. Готувати інкубаційну суміш бажано в затемненій кімнаті. Для її приготування готують розчин 1 і 2.

Приготування розчину 1 α -нафтилфосфат натрію беруть 2,0-2,1 мг, оптимальною кількістю α -нафтилфосфата є 2,0 мг. Для розчинення додавали 1,3 мл дистильованої води, 0,6612 мл буферної суміші невеликими порціями, помішуючи.

Приготування розчину 2

Беруть 5 мг барвника нейтрального міцного синього і розчиняють його в 2,5 мл буферної суміші змішуючи їх поступово (рН 5,0).

Отримані розчини змішують, фільтрують у темряві бажано через скляний фільтр .

Інкубація мазків проводиться виключно в темряві протягом 2 годин. Після фіксації мазки висушують на повітрі в темному місці. На фіксовані формаліном мазки наноситься рівномірним шаром інкубаційна суміш. Періодично необхідно додавати суміш, оскільки відбувається випаровування рідини, яка включає в себе легко випаровуючі речовини (α -нафтол) і при температурі. Після інкубації мазки промивають під проточною водою, потім дистильованою водою і висушують на повітрі в темному місціт .

Для диференціювання нейтрофільних гранулоцитів від інших клітин крові надалі фарбуємо ядра (бажано на наступний день для

кращої реакції інкубаційної суміші) клітин фарбою 0,5% водним розчином метиленової сині протягом від 30 секунд до 1 хвилини. Після фарбування фарбу зливають, промивають дистильованою водою і висушують на повітрі в темряві.

Мікроскопію проводять із застосуванням імерсійної системи при збільшенні (90*15).

Результати отриманих даних при мікроскопії мазків.

Активність кислої фосфатази визначають за кількістю гранул червоно-коричневого кольору в цитоплазмі нейтрофілів, ядра яких пофарбовані в блакитний колір.

Візуально проводять оцінку цитохімічної реакції за Astaldi.

Середній цитохімічний індекс виводять за такою формулою, попередньо підраховуючи 100 нейтрофілів:

$$\text{сци} = \frac{0 \cdot \text{а} + 1 \cdot \text{б} + 2 \cdot \text{в} + 3 \cdot \text{г} + 4 \cdot \text{д}}{100},$$

де а, б, в, г, д - кількість клітин відповідно 0, 1, 2, 3, 4-го ступеня.

Даний спосіб дозволяє експрес-методом визначити мікробіцидні властивості системи крові, зокрема визначення кислої фосфатази в нейтрофільних гранулоцитах. Концентрація вмісту ферменту кислої фосфатази вказує на стан імунного статусу та загальний клінічний стан організму [31].

Мієлопероксидазну активність гранулоцитів проводили за методом Graham, Knoll [26]. Принцип заснований на явищі окиснення бензидину пероксидом водню в присутності пероксидази у коричневий оксибензидин.

Для проведення дослідження використовували наступні реактиви:

1. 4% формаліново-спиртовий розчин (1 частина 40% формаліну й 9 частин 96⁰ етилового спирту);

2. Пероксидазний реактив: бензидин (4 мкг) розчиняли у 6 мл 96⁰ етилового спирту, додавали 4 мл води й 0,02 мл 3% перекису водню;

3. Барвник Романовського-Гімзи.

Хід визначення. Свіжі мазки крові фіксували у 4% формаліново-спиртовому розчині протягом 30 с. Після фіксації обмивали у проточній воді й висушували. Надалі заливали пероксидазним реактивом на 5 хв. Ретельно промивали в проточній воді й висушували. Дофарбовували барвником Романовського-Гімзи.

РОЗДІЛ 3.

АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

3.1. Вміст мієлопероксидази у досліджуваних мишей

Нами було проведено пілотне якісне визначення вмісту основних ферментів у препаратах крові досліджуваних тварин. За допомогою розрахунку середнього цитохімічного коефіцієнту для кожного із досліджуваних ферментів, ми намагалися виявити загальні тенденції впливу інтерлейкіну-2 на біохімічні показники клітин периферичної крові мишей. Отримані показники наведено в таблиці 3.1. та на рисунку 3.1.

Таблиця 3.1

Середній цитохімічний коефіцієнт вмісту мієлопероксидази у мишей досліджуваних груп, ум.од.

Групи досліджуваних		Етапи дослідження		
		1 (2 тиждень)	2 (4 тиждень)	3 (6 тиждень)
Експериментальна	I	1,19	1,24	1,33
	II	1,3	1,41	1,63
	III	1,42	1,84	1,95
	IV	1,29	1,8	1,95
Контрольна		1,13	1,14	1,16

З'ясовано, що вміст мієлопероксидази у мишей експериментальних груп був вище, ніж у тварин контрольної групи. Зауважимо, що у контрольній групі тварин (які знаходились тільки під впливом фізичних навантажень) показники мієлопероксидази не змінювалися протягом всього експерименту. Як можна бачити з рисунка 3.1, показники вмісту мієлопероксидази у мишей, що отримували циклоспорин збільшувалися

протягом експерименту, але це зміни не були достовірними. Натомість, у групах II, III та IV (де тварини отримували інтерлейкін-2 у різних концентраціях) зміни були більш помітними.

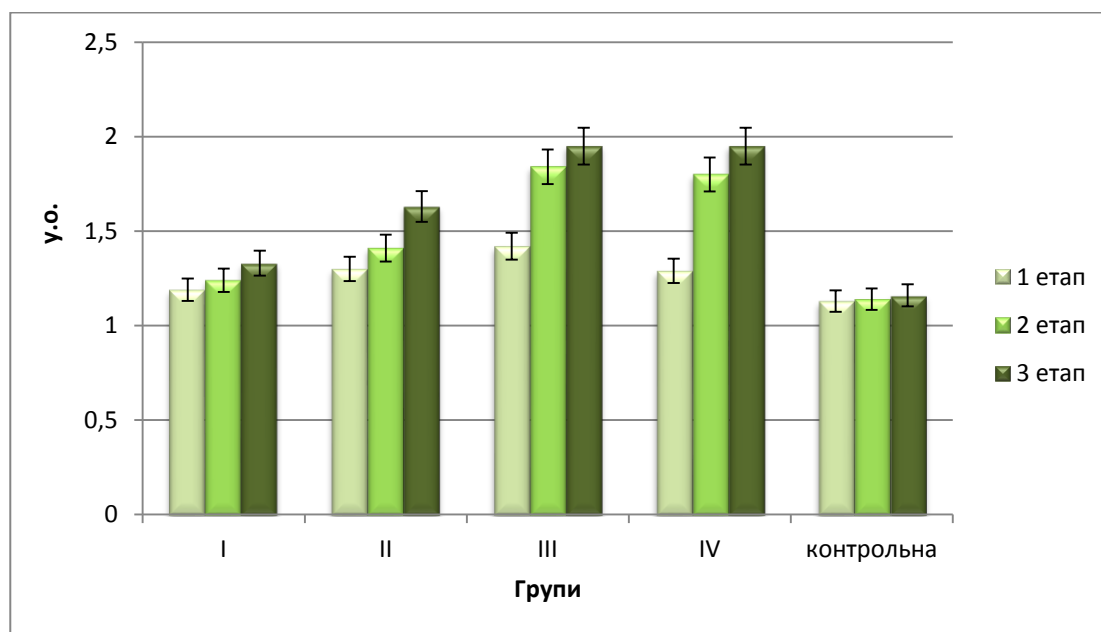


Рис. 3.1. Середньостатистичні показники вмісту мієлопероксидази у дослідних тварин на різних етапах експерименту, ум. од.

Тут і надалі. Примітка: статистично достовірна різниця між показниками ($p \leq 0,05$)

В усіх групах зафіксовано зростання мієлопероксидазної активності протягом експерименту, причому найбільшу таке зростання стосувалося мишей, що отримували середні та високі дози інтерлейкіну-2. Також відмітимо, що статистично значимими були відмінності між першим та другим етапами, а між другим та третім активність зростала, але у меншому ступені. [38]

Для того, щоб прослідкувати динаміку змін мієлопероксидазної активності ми представили порівняння змін місту фермента на кожному етапі дослідження окремо (рис. 3.2-3.4). На рисунку 3.1. показано, найбільшою, на першому етапі дослідження, була мієлопероксидаза активність у III групі, а найменшою – у I групі та у контролю.

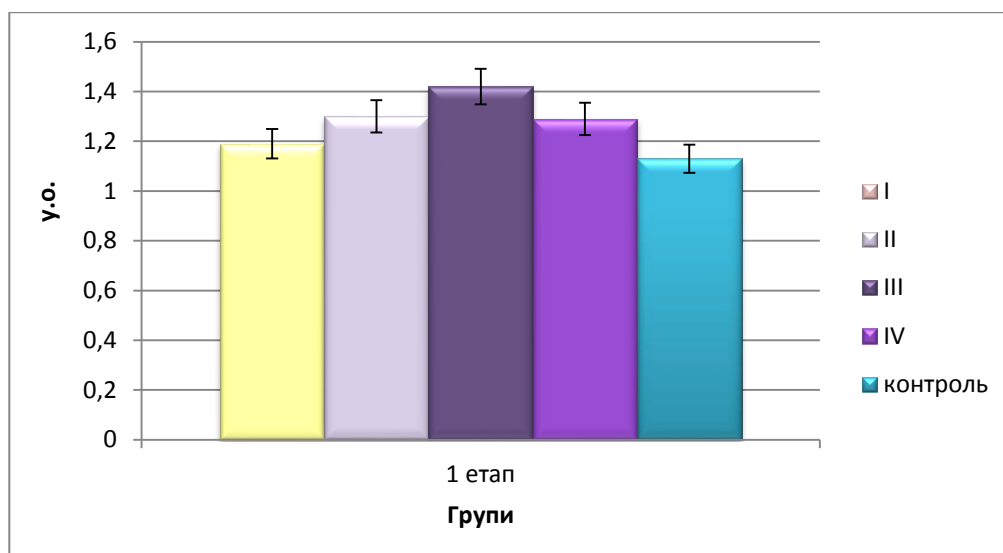


Рис. 3.2. Середньостатистичні показники вмісту мієлопероксидази у дослідних тварин на першому етапі експерименту, ум. од.

На другому етапі характер мієлопероксидазної активності дещо змінився. Як і на першому етапі найменшим (нормальним) було значення вмісту фермента у контрольній групі. Дещо вищим воно було у першій та другій дослідних групах, а найбільшим у групах III і IV.

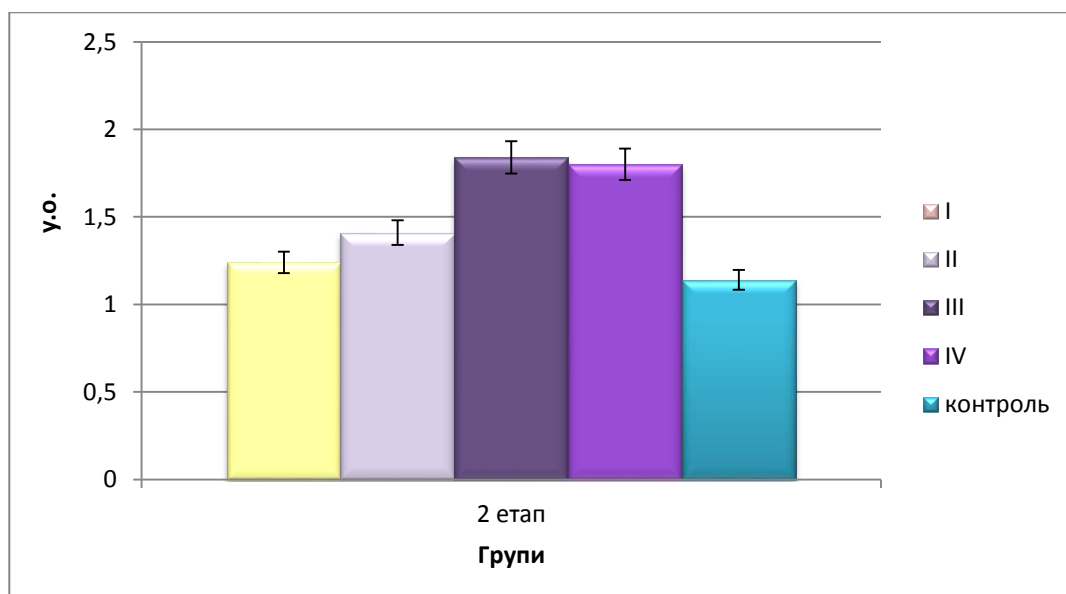


Рис. 3.3. Середньостатистичні показники вмісту мієлопероксидази у дослідних тварин на другому етапі експерименту, ум. од.

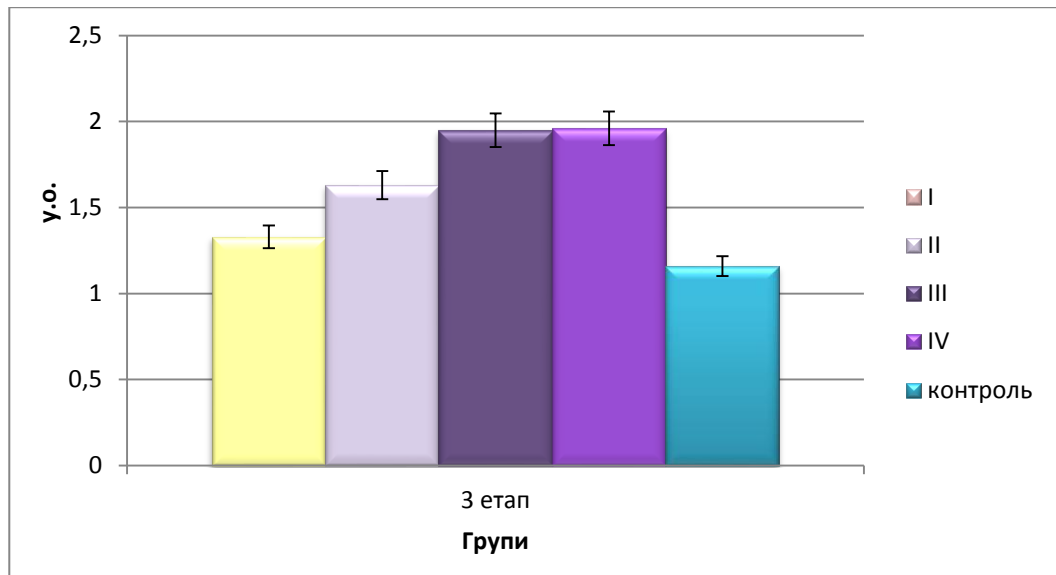


Рис. 3.4. Середньостатистичні показники вмісту мієлопероксидази у дослідних тварин на третьому етапі експерименту, ум. од.

Третій етап продемонстрував майже ідентичні з другим етапом результати, хоча вміст мієлопероксидази в II- IV групах став ще вищим.

Таким чином ми з'ясували, що інтерлейкін-2 має дозозалежний вплив на показники мієлопероксидазної активності. Також інтерлейкін-2 підвищує активність даного ферменту.

3.2. Вміст лужної фосфатази у досліджуваних мишей

Лужна фосфатаза є ферментом, який дефосфорилує багато типів молекул (нуклеотиди, білки, алкалоїди тощо. Тож, зважаючи на його важливість, ми визначили його вміст у клітинах периферичної крові досліджуваних тварин (табл. 3.2 та рис. 3.5).

З'ясовано, що у контрольній групі середній цитохімічний коефіцієнт дорівнював 1,47 у.о. – 1,4 у.о., що є нормальним. Ці показники практично не змінювалися протягом експерименту. У першій експериментальній групі показники активності лужної фосфатази теж практично не змінювалися протягом експерименту.

Таблиця 3.2

Середній цитохімічний коефіцієнт вмісту лужної фосфатази у мишей досліджуваних груп, ум.од.

Групи досліджуваних		Етапи дослідження		
		1 (2 тиждень)	2 (4 тиждень)	3 (6 тиждень)
Експериментальна	I	1,51	1,48	1,45
	II	1,61	1,87	2,13
	III	1,92	2,04	2,12
	IV	1,61	2	2,27
Контрольна		1,47	1,41	1,4

Примітки: * - статистично достовірна різниця між групами досліджуваних; ($p \leq 0,05$); ♦ - статистично достовірна різниця між показниками всередині однієї групи, ($p \leq 0,05$).

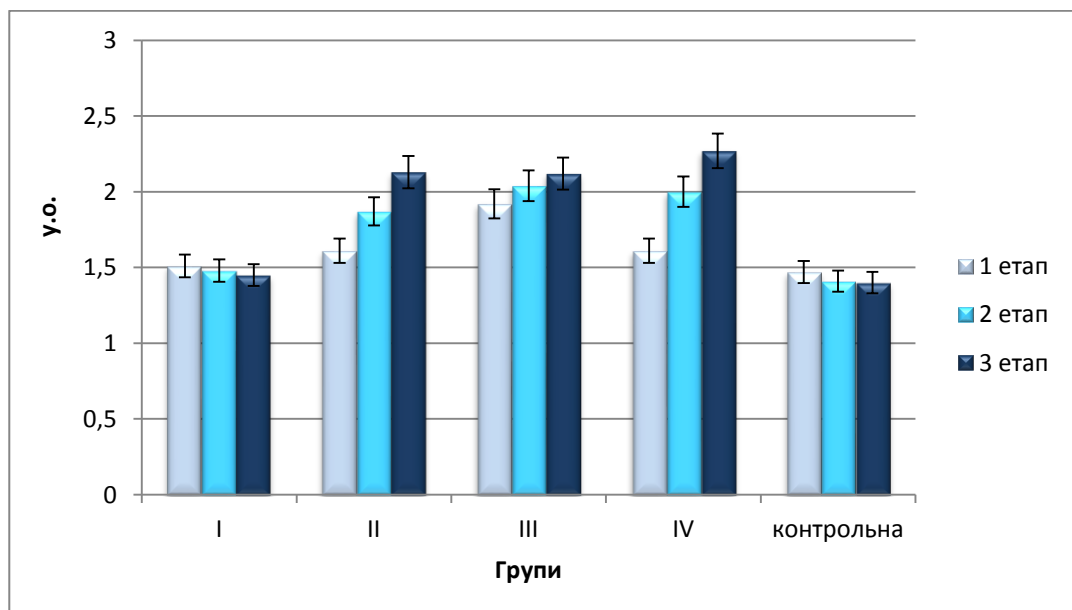


Рис. 3.5. Середньостатистичні показники вмісту лужної фосфатази у дослідних тварин на різних етапах експерименту, ум. од.

З'ясовано, що у тварин дослідних груп (які отримували інтерлейкін-2 у різних концентраціях) активність лужної фосфатази різко зросла. Причому, найбільше це зростання стосувалося III групи, де тварини отримували інтерлейкін-2 у середній терапевтичній дозі.

Ми розглянули особливості змін вмісту ферменту в залежності від етапу дослідження. На першому етапі (рис. 3.6) показано, що вміст лужної фосфатази в усіх групах крім III статистично не відрізнявся від показників контрольної групи.

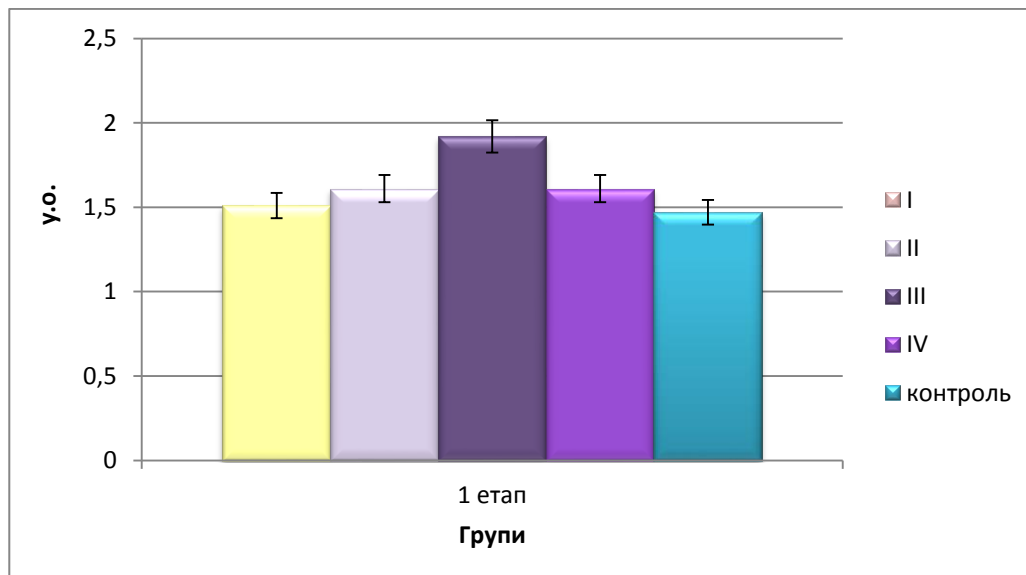


Рис. 3.6. Середньостатистичні показники вмісту лужної фосфатази у дослідних тварин на першому етапі експерименту, ум. од.

Лише у групі, де тварини отримували інтерферон-2 у концентрації 7500 МО/кг, ми зафіксували різке зростання вмісту ферменту.

На другому етапі (рис. 3.7) розподіл був дещо іншим.

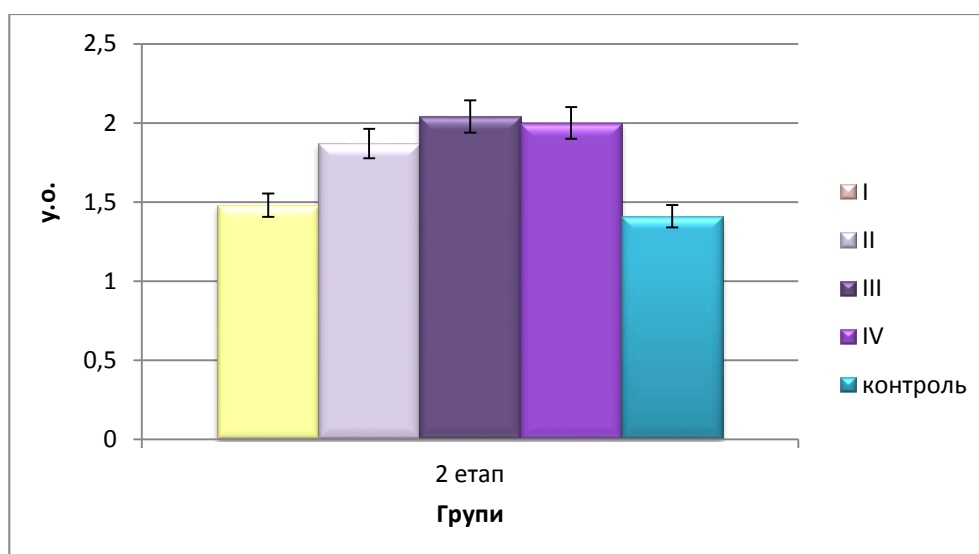


Рис. 3.7. Середньостатистичні показники вмісту лужної фосфатази у дослідних тварин на другому етапі експерименту, ум. од.

Статистично не відрізнялися від контрольної групи показники мишей, яким вводили циклоспорин, який є інгібітором інтерлейкіну-2. У групах, де вводили інтерлейкін-2 зафіксовано статистично значиме сильне зростання вмісту лужної фосфатази.

Третій етап дослідження виявив наступне (рис. 3.9).

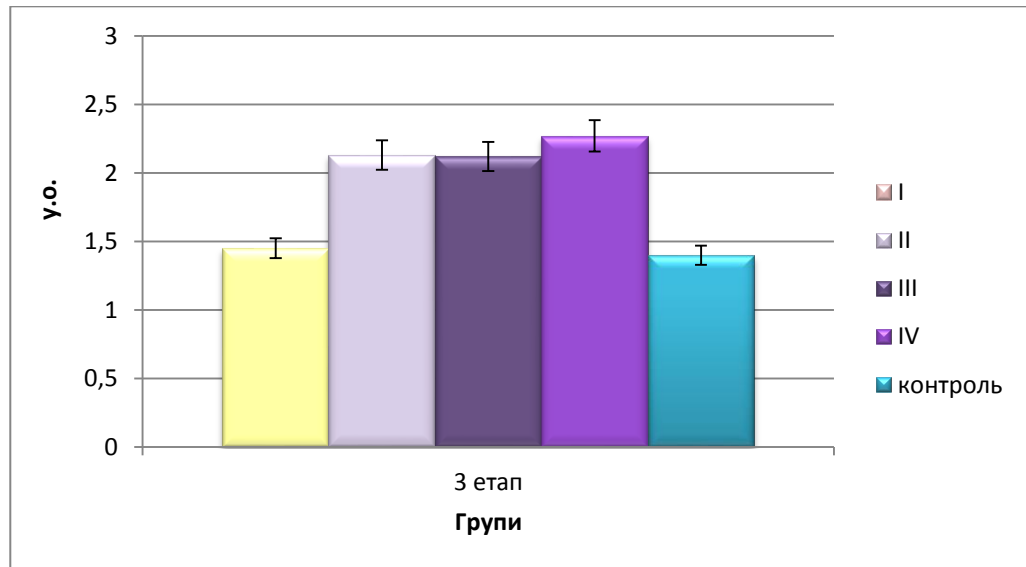


Рис. 3.8. Середньостатистичні показники вмісту лужної фосфатази у дослідних тварин на третьому етапі експерименту, ум. од.

Як і на попередніх етапах дослідження показники в першій експериментальній групі та у контрольній групі не відрізнялися статистично. Інтерлейкін-2 в усіх концентраціях діяв як стимулятор синтезу та накопичення в лейкоцитах периферичної крові лужної фосфатази, особливо у групі із найбільшою концентрацією введеного препарату.[41]

3.3. Вміст кислої фосфатази у досліджуваних мишей

Для створення більш повної картини ферментативної активності лейкоцитів периферичної крові в умовах дії інтерлейкіну-2 ми провели визначення вмісту кислої фосфатази. Отримані результати наведено у таблиці 3.3. та на рисунку 3.9.

Таблиця 3.3

Середній цитохімічний коефіцієнт вмісту кислій фосфатази у мишей досліджуваних груп, ум.од.

Групи досліджуваних		Етапи дослідження		
		1 (2 тиждень)	2 (4 тиждень)	3 (6 тиждень)
Експериментальна	I	1,46	1,32	1,42
	II	1,52	1,69	1,87
	III	1,54	1,94	2,05
	IV	1,61	1,8	2,04
Контрольна		1,24	1,22	1,21

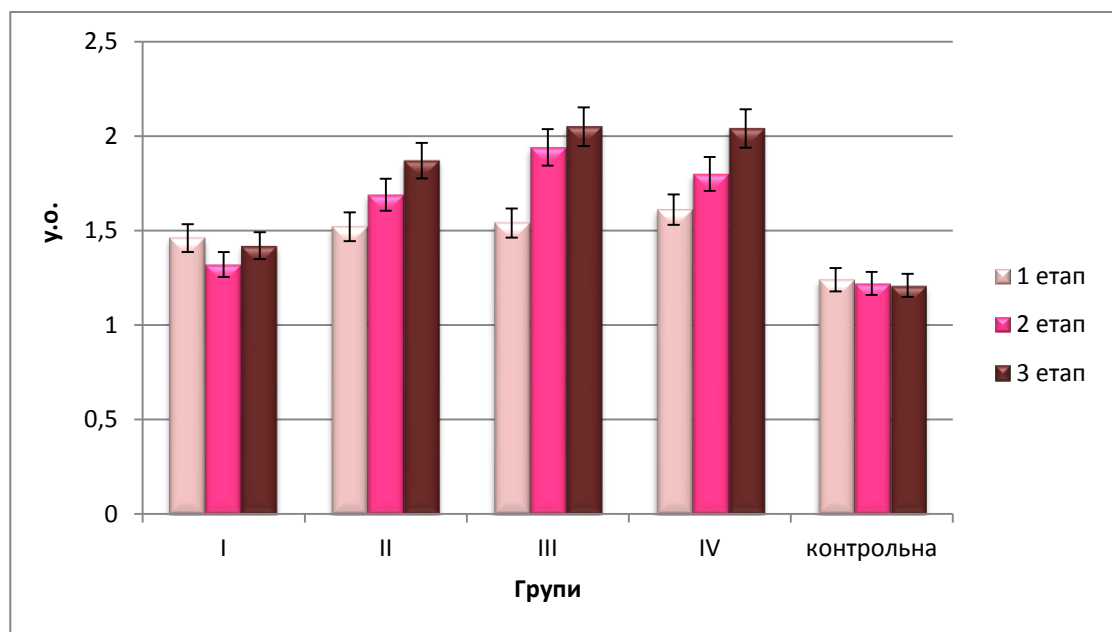


Рис. 3.9. Середньостатистичні показники вмісту кислій фосфатази у дослідних тварин на різних етапах експерименту, ум. од.

Як можна бачити, показники у першій групі були достовірно вищими за контрольну групу, але, в той же час, достовірно нижчими ніж показники тварин, які отримували різні дози інтерлейкіну-2. На першому етапі зростання вмісту кислій фосфатази було незначним, але вже надолі її концентрація стрімко зростає в групах II-IV.

На рис. 3.10 показано, що на першому етапі дослідження (2 тижень) вміст кислоти фосфатази зріс порівняно із контролем в усіх групах. Ми можемо бачити, що зростання було дозо залежним, хоча статистично це не підтвердилося.

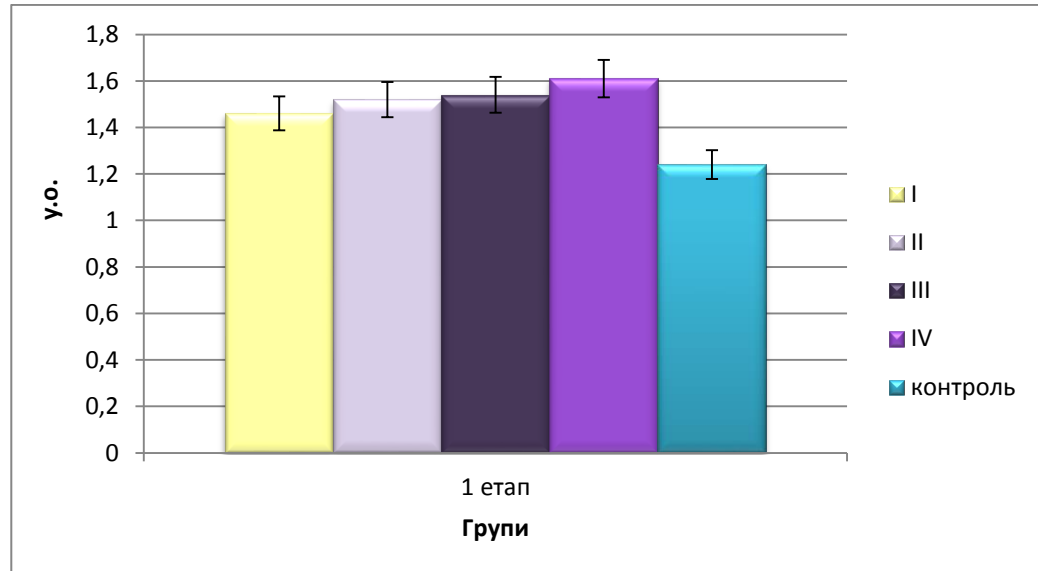


Рис. 3.10. Середньостатистичні показники вмісту кислоти фосфатази у дослідних тварин на першому етапі експерименту, ум. од.

На другому етапі (рис. 3.11) ми бачимо, що показники вмісту кислоти фосфатази різко збільшуються у порівнянні із контролем та групою I.

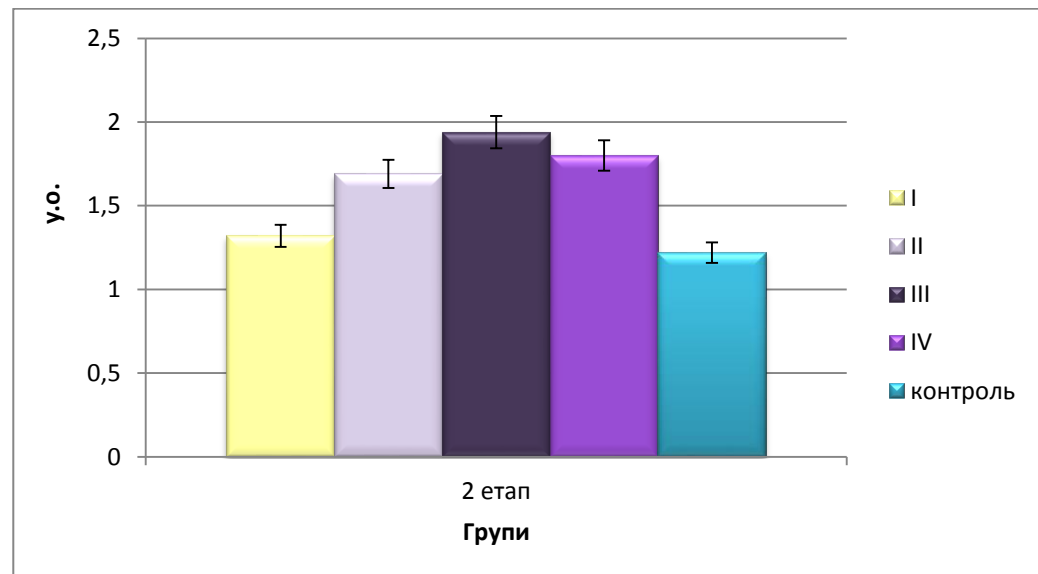


Рис. 3.11. Середньостатистичні показники вмісту кислоти фосфатази дослідних тварин на другому етапі експерименту, ум. од.

На рисунку 3.12 показано, що тривале уведення інтерлейкіну-2 є стимулюючим фактором для зростання активності лужної фосфатази.

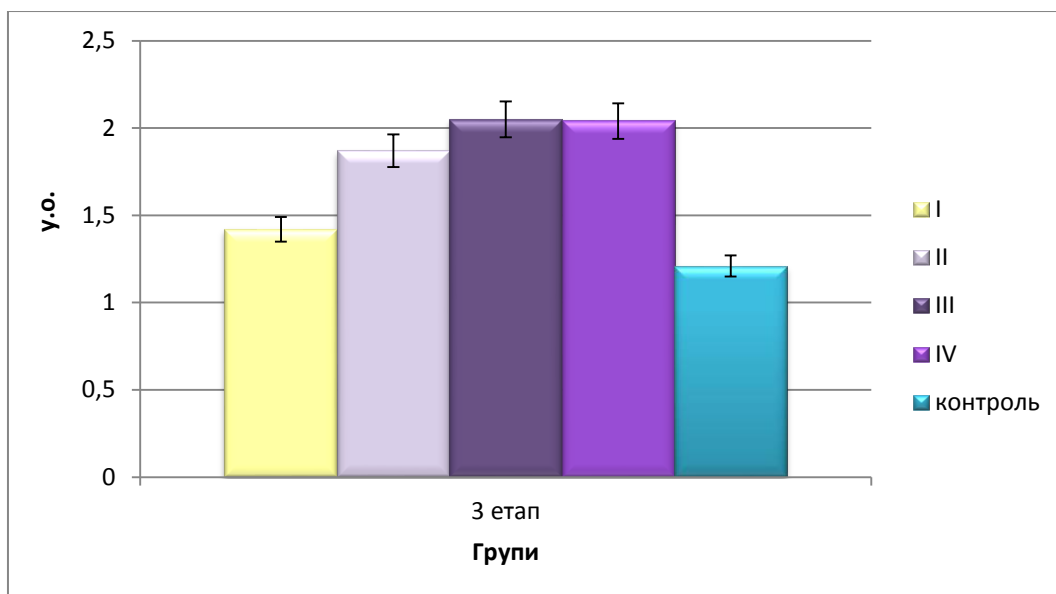


Рис. 3.12. Середньостатистичні показники вмісту кислої фосфатази дослідних тварин на третьому етапі експерименту, ум. од.

Причому, найбільшим було збільшення вмісту ферменту у групах, де вводили середні та високі дози інтерлейкіну-2.

ВИСНОВКИ

1. Інтерлейкін-2 є одним з найважливіших цитокінів, він контролює проліферацію та диференціювання Т-залежних клітин. Він грає роль центрального регуляторного цитокіну, який визначає тип і тривалість імунної відповіді і бере участь в реакціях як набутого, так і вродженого імунітету. Багатогранність біологічної активності ІЛ-2 дозволяє при його застосуванні як імунну модулятор розраховувати не тільки на корекцію проявів імунної недостатності, але і на оптимізацію функціонування всієї системи імунітету і адекватній її взаємодії з іншими системами організму.
2. З'ясовано, що інтерлейкін-2 стимулює синтез мієлопероксидази. Так, в усіх групах зафіксовано зростання мієлопероксидазної активності протягом експерименту, причому найбільше - у мишей, що отримували середні та високі дози інтерлейкіну-2. Статистично значимими були відмінності між першим та другим етапами, а між другим та третім активність зростала, але у меншому ступені.
3. Показано, що у мишей експериментальної групи відбулися зміни активності лужної фосфатази. Інтерлейкін-2 в усіх концентраціях викликає збільшення вмісту ферменту у гранулах лейкоцитів. Пригнічення інтерлейкіну-2 викликає зменшення вмісту лужної фосфатази у гранулах лейкоцитів.
4. Інтерлейкін-2 є фактором, який збільшує вміст кислої фосфатази у гранулах лейкоцитів. Найбільшим є збільшення вмісту ферменту у групах тварин, яким вводили середні та високі дози інтерлейкіну-2

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бабаченко И.В. Рекомбинантный ИЛ-2 – Ронколейкин– в терапии инфекционных заболеваний у детей. / И.В. Бабаченко, Т.К. Стебунова, И.В. Ульянова. //АДАИР, 2005: vol. 6, suppl. 1, p. 233.
2. Бабийчук В.Г. Содержание цитокинов в сыворотке крови после ритмических холодовых воздействий. Проблемы криобиологии. 2007;17(4):356-364.
3. Башкина О.А. Клинико-иммунологический мониторинг и цитокиноterapia у детей с рецидивированием респираторных заболеваний. // Автореферат дисс. на соиск. уч. ст. д-ра. мед. наук. - Москва, 2006. – 47 с.
4. Башкина О.А. Учебник: Оценка эффективности ингаляционного введения иммунокорректоров у часто болеющих детей. // Тезисы докл. XI Росс. Нац. Конгр. «Человек и лекарство» / О.А. Башкина., Е.В. Красилова, В.А. Алёшкин, С.С. Афанасьев, В.О. Рубальский - Москва, 2004.с 421
5. Вастьянов Р.С., Олейник Ф.Ф. Нейротропные эффекты цитокинов и факторов роста. Успехи физиол. наук. 2007;38(1):39-54.
6. Володин Н.Н. Клиническая эффективность иммуномодулирующей терапии Ронколейкином в комплексном лечении неонатального сепсиса. // VII Всеросс. науч. форум«Дни иммунологии в Санкт-Петербурге». Матер. симп. «Эффективность Ронколейкина(интерлейкина-2) при лечении иммунодефицитов различной этиологии» / Н.Н. Володин, М.В. Дегтярёва, И.Г. Солдатова, А.С. Симбирцев, А.Ю. Котов, А.М. Ищенко, А.В. Жахов, С.А.Синёва. - с. 48-50. – СПб., 2003.
7. Гасюк О.М., Бесчасний С.П. Інтерлейкіновий профіль дітей в умовах слухової сенсорної дериwації. Український журнал медицини, біології та спорту. 2016;1(1):126-129.

8. Зотова В.В. Герпесвирусная инфекция у детей– диагностика и этиотропная терапия. // Вопросы современной педиатрии, / В.В. Зотова, В.Л. Павленко, Н.Ф. Безручко, Е.Ф. Ефремова, Л.В. Киселёва. - 2004: том3, приложение №3, с. 41.
9. Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.
10. Иммунологические методы исследований / Под ред. И. Лефковитса, Б. Пернуса. - М.: Мир, 1988. – 530 с.
11. Иммунотерапия Ронколейкином острых синуситов. Метод. рек. Составители: Лавренова Г.В., Катинас Е.Б., Галкина О.В. // СПб, 2003 – 19 с.
12. Инфекционные болезни у детей: учебник для педиатрических факультетов медицинских вузов. / Под ред. проф. В.Н. Тимченко. - 2-е изд., испр. и доп. - СПб: СпецЛит, 2006. – 576 с.
13. Калиниченко ЛС. Цитокины в регуляции окислительных и антиоксидантных процессов в структурах головного мозга у крыс при остром эмоциональном стрессе [автореферат]. Москва: Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина; 2012. 26 с.
14. Каркищенко В.Н. Особенности интерпретации показателей работоспособности лабораторных животных по плавательным тестам с нагрузкой / В.Н. Каркищенко, Н.Н. Каркищенко, Е.Б. Шустов, И.А. Берзин, Ю.В. Фокин, О.В. Алимкина. // Биомедицина. 2016. №4. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/osobennosti-interpretatsii-pokazateley-rabotosposobnosti-laboratornyh-zhivotnyh-po-plavatelnym-testam-s-nagruzkoj> (дата обращения: 23.04.2020).
15. Кетлинский С.С. Цитокины. / С.С. Кетлинский, А.С. Симбирцев - Москва: Фолиант; 2008. 552 с.

16. Козлов В.К. Цитокиноterapia: патогенетическая направленность при инфекционных заболеваниях и клиническая эффективность: Руководство для врачей. СанктПетербург: Альтер Эго; 2010. 148 с.
17. Лабораторные методы исследований в клинике: Справочник / Под ред. проф. В.В. Меншикова. – М.: Медицина, 1987. - 368 с.
18. Ованесян И.Г. Современные представления о роли цитокинов в гомеостазе. Научномедицинский журнал. 2006;4:8-17.
19. Павлова А.А. Цитокины и их роль в патогенезе множественной миеломы (Обзор литературы). Гематология. 2013;14:313-335.
20. Раджабкадиев Р.М. Сопоставление уровня иммунорегуляторных цитокинов и некоторых антропометрических показателей высококвалифицированных спортсменов. Медицинская иммунология./ Р.М.Раджабкадиев, Н.А. Ригер, Д.Б. Никитюк, А.Г. Галстян, А.Н.Петров, А.О. Евсюкова и др. 2018;20(1):53-60.
21. Сарайкин Д.А. Функциональное состояние организма юных спортсменов на разных этапах тренировочного процесса [автореферат]. Челябинск: Челябинский государственный педагогический университет; 2012. 24 с.
22. Селье Г. Очерки об адапционном синдроме / Г. Селье. Москва: Медгиз; 1960. 254 с.
23. Серебряная Н.Б. Новые подходы к терапии герпесвирусной инфекции. Пособие для врачей. / Н.Б. Серебряная, В.Н. Егорова. - Санкт-Петербург: Новая альтернативная полиграфия, 2007. – 28 с.
24. Симбирцев А.С. Цитокины – новая система регуляции защитных реакций организма. Цитокины и воспаление. 2002;1:9-16. 22. Симбирцев АС. Цитокины: классификация и биологические функции. Цитокины и воспаление. 2004;3(2):16-22.
25. Спосіб визначення активності кислої фосфатази в мазках крові. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://uapatents.com/4->

36285-sposib-viznachennya-stanu-aktivnosti-kislo-fosfatazi-limfocitiv.html

26. Стаценко Е.А. Профилактика и коррекция нарушений функционального состояния у высококвалифицированных спортсменов в условиях тренировочного процесса [автореферат]. Москва: Федеральный научный центр физической культуры и спорта; 2014. 47 с.
27. Сташкевич Д.С. Актуальные вопросы иммунологии: система цитокинов, биологическое значение, генетический полиморфизм, методы определения : учеб. Пособие. / Д.С. Сташкевич, Ю.Ю. Филиппова, А.Л. Бурмистрова - Челябинск: Цицеро; 2016. 82 с.
28. Тимченко В.Н. Возможности и перспективы цитокиновой терапии вирусных гепатитов у детей. // Матер. первого конгр. педиатров-инфекционистов «Актуальные вопросы инфекционной патологии у детей», / В.Н. Тимченко, И.В. Бабаченко, И.В. Ульянова, О.А. Дробаченко, И.В. Новая - Москва, 2002.
29. Тимченко В.Н. Оценка клинической эффективности иммуномодулирующих препаратов в терапии вирусных гепатитов у детей. / В.Н. Тимченко, И.В. Бабаченко, И.В. Ульянова, Р.А. Иванова, Ф.А. Габбасова, Н.Г. Караськова. // Детская больница, 2002: №3(9), с. 18-20.
30. Тимченко В.Н. Результаты использования препарата Ронколейкин у детей при лечении вирусных гепатитов с гемоконтактным механизмом заражения. / В.Н. Тимченко, И.В. Бабаченко, Н.Г. Караськова, О.А. Дробаченко. // Матер. науч. конф. «Клинические перспективы в инфектологии», с. 186-187. - СПб, 17-18 октября 2001.
31. Тимченко В.Н. Оценка эффективности препаратов этиотропной направленности при лечении вирусных гепатитов с

- гемоконтактным механизмом заражения у детей. / В.Н.Тимченко, И.В. Бабаченко, И.В. Ульянова, Н.Г. Караськова, Р.А. Иванова, М.М. Воробьёв. // Современные технологии диагностики и лечения детей и подростков. Сб. науч. трудов, посвящ. 5-летнему юбилею детской инфекционной больницы №5 им. Н.Ф. Филатова, СПб., 2001. С. 145.
- 32.Тимченко В.Н. Клиническая эффективность иммуномодулирующих препаратов в терапии вирусных гепатитов В и С у детей. / В.Н. Тимченко, И.В. Бабаченко, И.В. Ульянова, А.Г. Тюленева, В.П. Марышев. // Матер. науч.-практ. конф. педиатров России«Фармакотерапия инфекционных болезней у детей», с. 76.
- 33.Тимченко В.Н. Применение иммунокорректирующих препаратов в терапии вирусных гепатитов С гемоконтактным механизмом передачи у детей. / В.Н. Тимченко, И.В. Бабаченко, И.В. Ульянова, Г.С. Тюленева. // Цитокины и воспаление, 2002: том1, №2, с. 131.
- 34.Ульянова И.В. Опыт использования рекомбинантного интерлейкина-2 у детей, больных вирусными гепатитами«В» и«С». // International Journal on Immunorehabilitation, 2003: том5, №2, с. 197.
- 35.Хаитов Р.М. Иммунология : Учебник./ Р.М.Хаитов, Г.А. Игнатьева, И.Г.Сидорович . - Москва: Медицина; 2000. 432 с.
- 36.Швец В. А. Вплив інтерлейкіну-2 на поведінкову активність у тесті "відкрите поле" при фізичному навантаженні / В. А. Швец, Н. А. Дьяченко // VI Міжнародна заочна науково-практична конференція «Актуальні питання біологічної науки»: Збірник статей. – Ніжин: НДУ імені Миколи Гоголя, 2020. – С. 117-120.
- 37.Швец В. А. Інтенсивність перекисного окиснення ліпідів при адаптації до фізичного навантаження в умовах впливу інтерлейкіну-2 / В. А. Швец / Modern approaches to the introduction

of science into practice. Abstracts of X International Scientific and Practical Conference. San Francisco, USA 2020. Pp. 467-469.

38. Швець В. А. Участь цитокінів в адаптації до фізичного навантаження / В. А. Швець // Альманах науки. – 2019. – № 6/1 (27). – С. 4-6.
39. Швець В. А. Участь цитокінів у адаптаційних реакціях (огляд літератури) / В. А. Швець, О. М. Гасюк // Природничий альманах (біологічні науки). Вип. 27. – Херсон: ФОП Вишемирський В. С., 2019. – С. 145-161.
40. Ярилин А.А. Основы иммунологии : Учебник. - Москва: Медицина; 1999. 608 с.
41. Astaldi G. The glycogen content of the cells of lymphatic leukemia / G. Astaldi, J. Verga // Acta Haematol. – 1957. – Vol. 17, № 3. – P. 129 — 136.
42. Porsolt R.D. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments / R.D. Porsolt, M. Le Pinchon, M. Jalfre // Nature. - 1977. - № 5604. - P. 730–732. Режим доступу: <http://www.nature.com/nature/journal/v266/n5604/abs/266730a0.html>