

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

**Лейкограма периферичної крові лабораторних мишей в умовах дії
рекомбінантного інтерлейкіну 2**

Кваліфікаційна робота (проект)

на здобуття ступеня вищої освіти “бакалавр”

Виконала: студентка 412 групи

Спеціальності 014.05 Середня освіта
(біологія)

Освітньо-професійної програми
Середня освіта (біологія)

Андрєвська Маргарита Романівна

Керівник: кандидат біологічних наук,
доцент Гасюк О.М.

Рецензент: кандидат біологічних
наук, доцент Карпухіна Ю.В.

ЗМІСТ

ВСТУП	3
РОЗДІЛ 1. Огляд літературних джерел	5
1.1. Лейкограма крові, як показник її фізіологічного стану.....	5
1.2. Поняття про цитокіни.....	9
1.3. Інтерлейкін 2, як один з основних цитокінів імунної системи.....	12
РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи дослідження	17
2.1. Організація дослідження.....	17
2.2. Методика підрахунку лейкограми.....	18
2.2.1. Дослідження зафарбованих мазків крові.....	18
2.2.2. Розрахунок лейкограми.....	22
РОЗДІЛ 3. Аналіз отриманих результатів	24
3.1. Стан лейкограми у мишей контрольної групи.....	24
3.2. Стан лейкограми у мишей експериментальної групи.....	26
ВИСНОВКИ	37
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	38

ВСТУП

Актуальність дослідження. Інтерлейкіни – це білкові сполуки, вони є частиною імунітету організмів. Інтерлейкін-2 приймає важливу роль в реалізації імунної відповіді.

Таким чином вивчення теми «Лейкограма периферичної крові лабораторних мишей в умовах дії рекомбінантного 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, індукуює лімфокін-активованні кіллери. Крім всього перерахованого ІЛ-2 посилює секрецію IFN- γ Т-лімфоцитами. Та найголовніше, що інтерлейкін-2 формує ефективні захисні механізми, які спрямовані на запобігання проліферації неоттрансформованих клітин, наприклад: у хворих на гепатит (вірусний) в реплікативний період спостерігається висока спонтанна продукція ІЛ-2 [23, 42].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження виконане в межах роботи над науково-дослідною ініціативною темою «Адаптаційні процеси організму в умовах цитокінового навантаження» (державний реєстраційний номер 0119U101093), керівник доц. Гасюк О.М.

Мета дослідження – дослідити стан лейкограми периферичної крові лабораторних мишей в умовах дії рекомбінантного інтерлейкіну 2.

Об'єкт дослідження – лейкоцити периферичної крові.

Предмет дослідження – зміни лейкограми периферичної крові лабораторних мишей під впливом рекомбінантного інтерлейкіну 2.

Завдання дослідження:

1. Визначити вплив інтерлейкіну 2 на систему периферичної крові;
2. Дослідити співвідношення різних форм лейкоцитів у периферичній крові лабораторних мишей;

3. Дослідити співвідношення різних форм лейкоцитів у периферичній крові лабораторних мишей в умовах дії різних доз інтерлейкіну 2.

Методи дослідження. Аналітичний огляд наукової літератури з тематики випускної роботи; методика підрахунку лейкоцитарної формули, методи статистичної обробки результатів.

База дослідження. Лабораторія імунології кафедри біології людини та імунології факультету біології, географії і екології ХДУ.

Практичне значення одержаних результатів. Одержані результати можна використовувати при викладанні курсів «Імунологія», «Фізіологія людини і тварин», «Основи патології», для спеціальностей 091 Біологія, 014.05 Середня освіта (Біологія) та 014.05 Середня освіта (Біологія та здоров'я людини) та у шкільному курсі біології. Також вони дозволяють оволодіти практичними навичками роботи в клінічній лабораторії.

Структура роботи. Робота викладена на 42 сторінках, складається із вступу, 3 розділів, висновків, списку використаних джерел. У роботі є 4 таблиці та 9 рисунків.

РОЗДІЛ 1.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1.1. Лейкограма крові, як показник її фізіологічного стану

Лейкограма або лейкоцитарна формула — відсоткове співвідношення між окремими видами лейкоцитів. Визначають її на забарвлених мазках крові підрахунком 100 або 200 лейкоцитів за методами Меандра або Філіпченко. Лейкограма відіграє важливу роль у діагностиці [42].

Лейкоцитарна формула залежить від таких факторів як: біологічний вид, вік, конституції організму [3].

Всі лейкоцити крові поділяють на дві групи: гранулоцити і агранулоцити. Агранулоцити не мають зернистості (цитоплазматична зернистість) наприклад: лімфоцити, або мають азурофільну зернистість (дрібна зернистість), яка не визначає функціональне значення клітин, наприклад: моноцити. А до групи гранулоцитів відносять еозинофіли – клітини з ацидофільною зернистістю, базофіли – клітини з базофільною зернистістю та нейтрофіли, їх клітини забарвлюються по-різному [24].

У лейкограмі описуються такі клітини:

- Базофіли клітини, які містять і продукують гістамін та гепарин (біологічно активні речовини). Гепарин приймає участь у перешкоджанні зсідання крові у місці запалення, агістамін приймає участь у розм'яктуванні та загоєнні запалення. Саме у цьому є принцип збільшення базофілів під час заключної фази гострого запалення.

- Нейтрофіли – клітини, які виконують функції захисту організму від мікробів та токсинів, які проникають. Вони приймають участь у фагоцитозі клітин, що руйнуються, мікробів та ін.. а потім «перетравлюють» за допомогою власних спеціальних ферментів. Також

нейтрофіли декретують інтерферон та продукують лізосомні білки, які посилюють противірусну дію

- Моноцити приймають участь у фагоцитозі, а також здаті до руху. Вони фагоцитують пошкоджені клітини в осередку запалення, мікроби та лейкоцити, тобто вони виконують функції очищення та підготовлюють місце для регенерації.

- Лімфоцити здатні проникати не лише з крові до тканин, але й повертатися назад, також вони можуть жити до 20 років та більше. Тому що вони можуть розрізняти «свої» та «чужорідні» клітини за допомогою спеціальних рецепторів, які в свою чергу активуються після контакту з чужорідними речовинами, лейкоцити здійснюють синтез антитіл, знищують мутантні клітини організму, лізис чужорідних антитіл та відтворюють реакцію відторгнення трансплантату.

- Т-лімфоцити утворюються в червоному кістковому мозку, дозрівають у вилочковій залозі або тимусі, після чого потрапляють у селезінку, лімфатичні вузли або циркулюють у крові. Розрізняють декілька форм Т-лімфоцитів:

Клітини-хелпери (помічники) взаємодіють з В-лімфоцитами, перетворюють їх у плазматичні клітини.

Клітини-супресори (пригнічувачі) блокують надмірні реакції В-лімфоцитів і підтримують постійне співвідношення різних форм лімфоцитів.

Клітини-кілери (вбивці) здійснюють реакції клітинного імунітету. Вони взаємодіють з чужорідними клітинами або своїми, які набули невластивих їм якостей.

- В-лімфоцити утворюються в кістковому мозку, дозрівання проходять у лімфатичній тканині кишечника, червоподібного відростка, піднебінних і глоткових мигдалин.

- Нульові лімфоцити дозрівання в органах імунної системи не відбувається, у них є здатність при необхідності перетворюватися в Т- і В-лімфоцити

- Тромбоцити – клітини неправильної округлої форми, вони не мають ядер, розмір від 2 до 5 мікронів, утворюються в кістковому мозку, тривалість їх життя від 8 до 11 днів [14, 20, 31].

Існує 2 види здвигу лейкограми:

Праворуч – зменшення нормальної кількості паличкоядерних нейтрофілів та збільшення кількості сегментоядерних нейтрофілів з гіперсегментованими ядрами.

Ліворуч – збільшення кількості паличкоядерних нейтрофілів в периферичній крові [13].

Лейкоцитарну формулу розраховують за формулою:

$$X = \frac{A \times 1/4000 \times 20}{1600}, \text{ де:}$$

$X = \frac{A \times 1/4000 \times 20}{1600}$, де:

$$1600$$

X – кількість лейкоцитів в 1 мл крові,

A – кількість еритроцитів у 80ти малих квадратах сітки,

1/4000 об'єм одного малого квадрату у мм/кубічних,

20 – ступінь розведення крові,

1600 – кількість малих квадратів (100 великих) у яких рахували еритроцити [1].

Методи підрахунку лейкограми:

1) метод Шилінга визнає кількість лейкоцитів в чотирьох ділянках мазка. Підраховують майже завжди 100-200 клітин.

2) метод Філіпченко. Основою цього методу є те, що мазок візуально поділяють на 3 частини: початкову, середню та кінцеву. Підрахунок ведуть по прямій лінії поперек мазка від одного краю до іншого. Підраховують 100-200 клітин [2, 10].

Клінічне значення лейкоцитарної формули.

В клінічній практиці лейкоцитарна формула має велике значення, так як при різних змінах в організмі відсоткового вмісту одних видів клітин білої крові збільшується або зменшується за рахунок зменшення або збільшення в різних ступенях інших [24, 26].

Показаннями для проведення лейкограми можуть бути такі прояви, як:

- поганий сон;
- поганий апетит;
- надмірна пітливість;
- частий риніт;
- постійні ГРЗ та ГРВІ;
- збільшення лімфовузлів [18].

Данні лейкограми порівнюють з клінічними проявами хвороби.

Лейкограма має велике значення, так як при найменшій зміні в організмі відсотковий вміст одного виду клітин білої крові збільшується або зменшується через те, що відбувається збільшення або зменшення кількості інших клітин. За даними лейкограми можна робити висновки про хід хвороби, появу ускладнень або навіть передбачити результат хвороби. Лейкоцитарна формула дозволяє диференціювати такі хвороби: чума свиней (лімфоцитів та лейкоцитів) від рожи (лейкоцитоз та еозинофілія), інфлюенція від контагіозної пневмонії (нейтропенія) і тд. Данні які отримують з лейкоцитарної формули необхідно заставляти з клінічними проявами хвороби [2, 12, 17].

Також лейкограма дає висновки про стани патологічних або запальних процесів, появи ускладнень різних процесів та спрогнозувати результат хвороби [38]. Наприклад : лейкемоїдні реакції – це процес зміни в крові та органах кровотворення, вони нагадують лейкоз та інші пухлини кровотворної системи, але завжди мають реактивний характер, без трансформації в пухлину. Ці реакції можуть бути викликані різними інфекціями, інтоксикацією, метастазами пухлин в кістковому

мозку або пухлинами. Механізм розвитку лейкемоїдних реакцій: посилений вихід в кров незрілих клітинних елементів. Підвищена продукція клітин крові, обмеження виходу клітин в тканини [4, 15].

Лейкемоїдні реакції викликають зміни в крові, лімфатичних вузлах, селезінці та кістковому мозку. Особливу групу реакцій складають зміни білкових фракцій крові [8].

1.2. Поняття про цитокіни

Цитокіни є найбільш універсальною системою регуляції, що здатна проявляти біологічну активність, як дистанційно так і при міжклітинному контакті. Цитокіни є системою-організатором організму, яка формує та регулює весь комплекс патофізіологічних зсувів при проникненні патогену [33].

На цей час відомо. Що цитокіни відіграють важливу роль між нервовою системою та клітинами імунної системи. Вони проникають крізь гематоенцефалічний бар'єр в окремих ділянках та впливає на функції мозку. Також інформація про підвищення концентрації деяких інтерлейкінів на периферії передається через шляхи нервової системи, тобто ця інформація поступає до мозку [23, 25].

На цей час показано існування функціональної дихотомії хелперної активності Т-лімфоцитів, що проявляється через наявність двох рестриктазних клонів, які продукують різноманітні інтерлейкіни, які активно модифікують дію патологічних процесів. Кожен цитокін або група мають перекриваємі, інгібуючою або синергічної активності по відношенню до інших цитокінів. Ця властивість цитокінів надає оптимальний розвиток імунної відповіді в рамках «цитокінового ланцюга» при участі нейтрофілів, каскад регулюючих інтерлейкінів, які залежать від Т-хелперів та Т-кіллерів та нейтрофілів і моноцитів.

Профіль синтезу цитокінів, відповідний характеристикам Th-1 або Th-2 клітин, але необов'язково опосередкований саме Т-лімфоцитами, визначається відповідно як Th1 або Th2 типи імунної відповіді [16, 21].

Передбачається. Що Th2 цитокіни забезпечують в першу чергу хелперний сигнал у відношенні до синтезу антитіл та приймають участь в розвитку алергічних реакцій, а також виконують імунорегулюючу функцію, в той час коли Th1 цитокіни залучені в реакції клітинного імунітету, а саме гіперчутливості уповільненого типу, запалення, клітина цитоконічність [30].

Характерною особливістю цитокінів, синтезуючих Th1 та Th2, є інгібіція диференціювання та ефекторних функцій реципроктних фенотипів Th клітин в рамках «цитокінової мережі» [19]

Цитокіновий каскад впливає на генерацію вродженої та адаптивної імунної відповіді. Від здатен або інколи неспроможний генерувати деякий тип цитокінів, також часто визначає результат і перебіг інфекційних процесів [22].

Групи цитокінів:

Прозапальні (забезпечують мобілізацію імунної відповіді).

Протизапальні (обмежують розвиток запалення).

Регулятори клітинного і гуморального імунітету (виконують такі функції: противірусні та цитотоксичні) [44].

Функції цитокінів:

- Вони є активними в дуже малих концентраціях.
- Взаємодія зі специфічним рецептором, який знаходиться на клітинній мембрані.
- Синергізм.
- Вони є антиген-неспецифічним фактором [28].

Цитокіни володіють наступними особливостями:

один і той же цитокін може продукуватися різними клітинами;
одна клітина може продукувати більше одного цитокіна;

один і той же цитокін може мати вплив на різні типи клітин; різні цитокіни можуть індукувати однакову відповідь і функцію конкретного типу клітин [21, 22].

Присутність факторів росту в нервовій та імунній системах є підставою щоб висунути гіпотезу про роль цитокінів в механізмах взаємодії між цими системами, що свідчить про можливе загальне функціонування механізмів регуляції експресії генів цитокінів для імунної та нервової систем [33].

Цитокіни, які приймають участь у реалізації вродженої імунної відповіді обумовлюють розвиток багатьох симптомів, які відносять до процесів запалення, таких як: біль в пошкоджених тканинах або лихоманка та набряк. Ця відповідь є неспецифічною але відбувається протягом декількох годин після першого контакту з мікроорганізмами, Це відіграє важливу роль у процесі позбавлення організму від інфекції. Основна функція вродженої імунної відповіді полягає у залученні ефективних клітин до ушкодженої ділянки [29].

Цитокіни поділяють на : інтерлейкіни, інтерферони, фактори цитолізу, трансформуючі фактори росту та хемокіни [39].

Цитокіни є функціональними регуляторними білками. Вони впливають на перебіг багатьох процесів та клітин організму, наприклад:

- імунна система організму;
- процес регуляції росту;
- диференціація та експресія генів;
- генерація вроджених і адаптивних імунних реакцій;
- перебіг і результат інфекційних захворювань [34, 36].

Цитокіни є універсальною системою регуляції, яка здатна проявляти біологічну активність, як при міжклітинному контакті так і дистанційно. Вони є системою-організатором організму, яка регулює та формує весь комплекс патофізіологічних зсувів при проникненні в організм патогену [33].

Класифікація цитокінів за функціями:

1. Гемопоетичні цитокіни – вони виконують функцію регуляції проліферації та диференціації всіх клітин кровотворної системи. До цих цитокінів відносять: тромбопоетин, еритропоетин і тд.

2. Цитокіни домінуючого запалення:

А) первинні протизапальні цитокіни – виконують функцію активації функцій тканин навколо себе

Б) вторинні запальні цитокіни – їх ще називають хемокіни – це цитокіни спеціального призначення, якими організм спрямовує лейкоцити та лімфоцити до вогнища запалення. До цієї групи входять понад 50 представників [41].

3. Цитокіни, які є організаторами лімфоцитарної імунної відповіді – вони регулюють диференціювання та проліферацію Т- і В-лімфоцитів та натуральних цитотоксичних клітин у периферичних лімфоїдних органах та тканинах.

4. Цитокіни, які є медіаторами імунного запалення – вони потрібні для того щоб активувати лейкоцити під час запалення.

5. Протизапальні або імуносупресорні цитокіни, вони пригнічують макрофаги а за деяких умов здатні проявляти себе як запальні цитокіни [27, 32, 35].

1.3. Інтерлейкін 2, як один з основних цитокінів імунної системи

Інтерлейкін-2 (ІЛ-2) - це білок (протеїн) виробляється організмом. Є фактором росту Т-лімфоцитів. Це речовини, які виробляються активними речовинами імунної системи в результаті різної дії на них антигенів, мито генів, антитіл к поверхневим білковим молекулам лімфоцитів, речовин хімічної природи [40].

Інтерлейкін-2 є одним з найважливіших цитокінів, який контролює проліферацію та диференціювання Т-залежних імунокомплексних

клітин та приймає участь у синтезі Т-хелперів та Т-кіллерів під дією інтерлейкіну-1. Нещодавно було виявлено, що деякі клітини, такі як нейрональні клітини та олігодендроцити приймають участь у синтезі ІЛ-2 [29].

ІЛ-2 необхідний для виживання супресивних функцій регуляторних Т-клітин, 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 Трег: за відсутності ІЛ-2 Т-супресори зникають з периферичних лімфоїдних органів, мабуть, тому, що дефіцит цього фактора росту призводить до загибелі клітин [43].

Інтерлейкін 1 стимулює специфічну ланку імунітету, впливаючи на функціональну активність Т- та В-лімфоцитів, інфільтруючих тканини та знаходяться в регіонарних лімфоїдних новоутвореннях. Експериментальне введення ІЛ-1 мишам приводить до стимуляції диференцировки попередників Т-лімфоцитів в кістковому мозку, посилюючи проліферацію ізольованих лімфоцитів тимусу та селезінки, підсилюється ним кількість інтерлейкіну-2 та підвищенню серед спленоцитівдалі клітин з фенотипом Т-хелперів. Крім того інтерлейкін-1 підсилює антитілоутворення, підвищуючи титр специфічних антитіл і число антитілоутворюючих клітин в селезінці імунізованих тварин [13].

Є припущення, що в гральних клітинах інтерлейкін-2 виконує ті ж функції, які виконує в імунній системі. Крім того на поверхні дегідрогіальних клітин був виявлений β-ланцюг ІЛ-2.

Інтерлейкін-2 в нервових клітинах може виконувати ті ж функції регуляції проліферації та диференціювання клітин, що і в імунній системі.

Інтерлейкін-2 являє собою основним цитокіном в родині інтерлейкін-2, в яку також входять також ІЛ-4, ІЛ-7, ІЛ-9, ІЛ-15 та ІЛ-21. Всі вони проявляють свої дії через рецептори інтерлейкіну-2 альфа та гама ланцюг [41]. 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. Також слід зазначити, що ІЛ-2 здійснює важливі функції по відношенню до інших клітин лімфоїдного ряду, включаючи НК-клітини і лімфоїдні клітини вродженого імунної відповіді [12, 41].

Біологічна роль інтерлейкіну-2.

Інтерлейкін -2 компенсує нестачу ендogenous ІЛ-2. Він відновлює синтез ендogenous ІЛ-2 активованими клітинами CD4 та CD8. Також він діє на такі клітини імунної системи: НК-клітини, Т-хелпери, Т-лімфоцити, В-лімфоцити, моноцити, тому що ІЛ-2 являє собою фактором активації, проліферації та диференцировки цих клітин. Також він регулює Th1/Th2 баланс. Інтерлейкін-2 відмінняє імунологічну толерантність, оберігає активовані Т-клітини від передчасної загибелі. ІЛ-2 здійснює регуляцію та взаємодію обох видів імунітету. Він стимулює реалізацію незалежного та залежного від антигену імунної відповіді, впливаючи на клітинний та гуморальний від імунітету [4].

Фармакокінетика інтерлейкіну-2.

При введенні інтерлейкіну-2 в організм спостерігається різке підвищення концентрації ІЛ-2 в плазмі крові, період його піврозпаду в сироватці приблизно 5-7 хвилин. При підшкірному введенні цей період піврозпаду збільшується майже в 3 рази. Концентрація ІЛ-2 в плазмі крові знижується швидше в перші 20 хвилин після внутрішньовенного введення препарату через те, що спостерігається швидке зв'язування вільного ІЛ-2 з рецепторами, які експересуються на клітинній поверхні циркулюючих моноцитів та лімфоцитів всіх субпопуляцій. Виведення

вільних молекул інтерлейкіну-2, які залишилися, здійснюється через нирки з процесом розпаду до окремих амінокислот.

Вплив стресу на експресію генів ІЛ-2.

Одною з причин пригнічення функцій імунної системи під час дії стресу вважають підвищення рівня глюкокортикоїдних гормонів. Глюкокортикоїди інгібують продукцію інтерлейкіну-2 в лімфоцитах периферичної крові та лімфоцитах селезінки.

Аналіз експресії гену ІЛ-2 в Т-клітинах після виділення їх з селезінки тварин, які знаходились під впливом стресу дозволило спостерігати за активуючими ефектами. Тобто при іммобілізуючому стресі спостерігається зниження ІЛ-2 та мРНК на 29-30%. Подібна ситуація виявлена також при активації експресії гену ІЛ-2 білковими факторами клітин мозку та селезінки[12].

При стресі відбувається зниження СБ на 40-50%. В той же час кількість продукції інтерлейкіну-2 та мРНК під дією СБ знижується на 20-40% в залежності від концентрації білків, які вносяться в культурне середовище.

Дослідження синтезу ІЛ-2 в клітинах головного мозку дозволило виявити стимулюючу дію стресу на експресію гена інтерлейкіну-2 через 4 години після застосування стимулу у внутрішній капсулі таламусу в моторній зоні кори головного мозку. Наявність зафарбованих клітин, які містять комплекс ІЛ-2 було значно менше ніж у випадку з c-fos, мРНК, кДНК, при цьому переважний розподіл комплексу спостерігають в паравентиккулярному ядрі.

Таким чином, можна виділити два варіанти регуляції гена ІЛ-2 в лімфоїдних та нейронних клітинах:

1. Кожен тип клітин синтезує білкові транскриптуючі фактори самостійно;
2. Здійснює транспорт цих білків або обмін між клітинами імунної та нервової системах.

Отже, стрес надає модулюючу дію на процеси, які відбуваються як в імунній так і в нервовій системах, та реалізуються вони на рівні експресії генів [31]

РОЗДІЛ 2.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Організація дослідження

Для дослідження використовували білих безпородних статевозрілих мишей-самців. У роботі 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). Дослідження проводилося протягом 6 тижнів. Було сформовано 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 підшкірно вводили фізіологічний розчин. Препарати вводили 3 рази на тиждень, перед кожним тренуванням. Через 4 тижні зробили перерву на 14 днів. Після чого на 6 тижні провели контроль післядії препарату [6].

Для оцінки 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. Мишей поміщали в циліндр (h = 30 см, d=30 см), наповнений теплою водою (t=25±1°C), де вони плавали до повного виснаження. Вантаж закріплювали в області міжребер'я стягуючою гумовою стрічкою. Критерієм виснаження були 3 безуспішні спроби всплти на поверхню або відмова і опускання на дно. Після чого 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. Перед початком експерименту було проведено попереднє тестування плавання (протягом 1 тижня) – для визначення орієнтовного часу працездатності з певним вантажем. Надалі 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[5].

Загальна частина експерименту проводилась спільно з аспіранткою кафедри біології людини та імунології Швець В. А. та із студенткою Савченко К. Г.

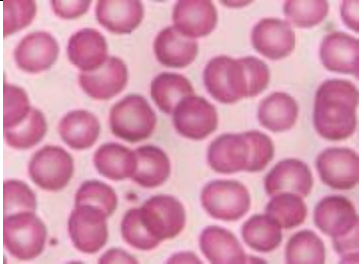
2.2. Методика підрахунку лейкограми

2.2.1. Дослідження зафарбованих мазків крові.

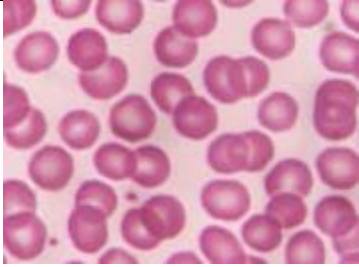
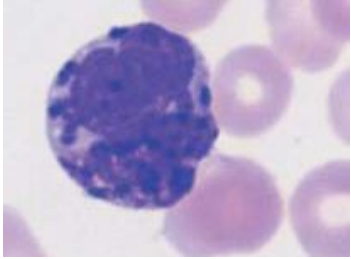
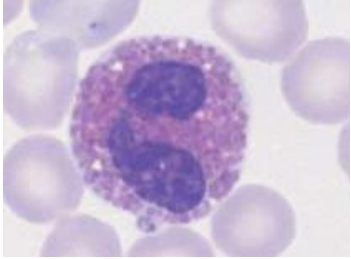
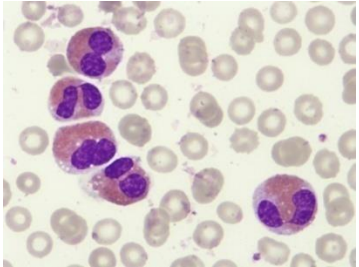
Дослідження зафарбованих мазків крові. Найчастіше використовують фарбування за Романовським-Гімзою. Пофарбовані мазки крові досліджують під мікроскопом, використовуючи при цьому об'єктив $\times 90$ і імерсійне масло. Останнє після роботи видаляють з мазка сухою ваткою. У зафарбованих мазках крові визначають розмір, форму, характер забарвлення клітин та їх структурних елементів - ядра, цитоплазми і включень; співвідношення між форменими елементами (табл. 2.1) [37].

Таблиця 2.1

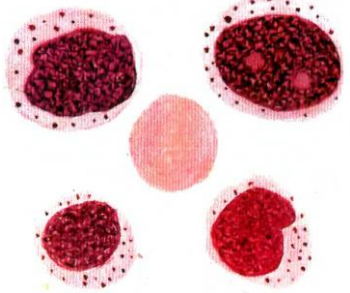
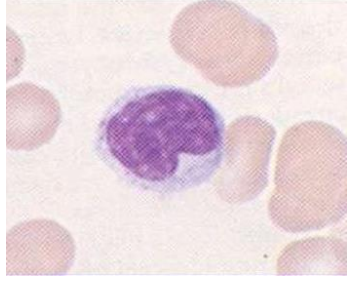

Морфологічний опис та ознаки клітин периферичної крові

Морфологічний опис	Зображення
<p>Еритроцити. При оцінці еритроцитів звертають увагу на їх розмір, форму, забарвлення і клітинні включення. Еритроцити ссавців в мазках крові округлої форми, у птахів, жаб і риб - овальної форми і містять ядро. Еритроцити фарбуються кислими барвниками в рожевий</p>	

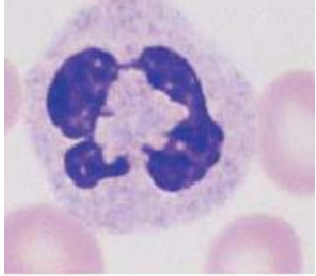
Продовження таблиці 2.1

Морфологічний опис	Зображення
<p>колір (ацидофільні), причому центральна частина виявляється більш блідою, так як центр еритроцита увігнутий. Таке фарбування - більш інтенсивне по периферії і бліде в центрі - називають ортохромазією, а еритроцити - ортохромними клітинами. Діаметр еритроцитів є різним у тварин і людини.</p>	
<p>Лейкоцити. Залежно від властивостей цитоплазми і характеру зернистості лейкоцити поділяють на гранулоцити, або зернисті (базофіли, еозинофіли і нейтрофіли) та агранулоцити, або незернисті (лімфоцити і моноцити)</p>	
<p>Базофіли. Округлої або овальної форми клітини діаметром 11 – 17 мкм. У зрілих форм ядро поліморфне, погано помітне, з неясними обрисами, забарвлене у фіолетовий колір або слабо-фіолетовий з бордовим відтінком. Цитоплазма блідо-рожева або блідо фіолетова, що обумовлено розчиненням гранул в процесі приготування мазка. Великі гранули округлі або розпливчасті, пофарбовані в темно-фіолетовий, темно-синій або чорний колір, нерідко зруйновані - на їх місці утворюються вакуолі.</p>	
<p>Еозинофіли. Великі округлої форми клітини діаметром 9 - 22 мкм. Ядро забарвлене у фіолетовий колір. Цитоплазма ніжно-блакитна з рожево-червоною або яскраво-червоною зернистістю (гранули круглі або злегка овальні). Характер ядра залежить від ступеня зрілості клітини: у зрілих форм ядро сегментоване, у молодих - округле. У коней, великої рогатої худоби і свиней ядро частіше складається з двох сегментів, а у овець, кіз і собак - з трьох. Найбільші гранули зустрічаються в цитоплазмі еозинофілів у коней (до 3 – 10 мкм), собак і кролів (до 1,5 – 10 мкм); у кішок гранули розташовані дуже густо, нерідко вони паличкоподібної форми і неоднакових розмірів.</p>	 

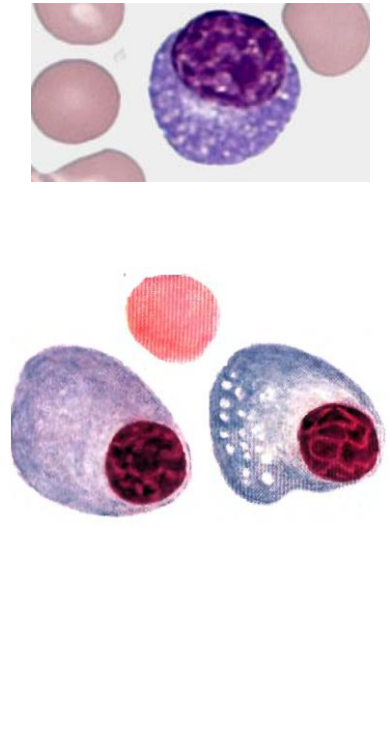
Продовження таблиці 2.1

Морфологічний опис	Зображення
<p>При розчиненні гранул на їх місці утворюються вакуолі, в розчавлених клітинах гранули лежать вільно, розсіпом.</p>	
<p>Нейтрофіли. Клітини округлої форми, розміром 9,5 - 14,5 мкм. Залежно від форми і ступеня забарвлення ядра розрізняють мієлоцити, юні, паличкоядерні і сегментоядерні нейтрофіли.</p>	
<p>Мієлоцити. Найбільш молоді клітини з нерівномірно забарвленим в фіолетовий колір масивним круглим або овальним ядром, розташованим частіше ексцентрично. Для ядерного хроматину характерно чергування темних і світлих ділянок. Цитоплазма клітин рожевого або світло-синього кольору, з дрібною ніжною рожевою зернистістю. У крові здорових людей і тварин мієлоцити не зустрічаються.</p>	
<p>Юні нейтрофіли. Містять забарвлене у фіолетовий колір ядро: широке з центральним вдавленням (бобоподібної форми) або трохи витягнуте (підковоподібне). Світлі ділянки хроматину змінюються більш темними. Цитоплазма рожевого кольору, іноді погано фарбується, з дрібною, ніжноюрожевою зернистістю. У периферичній крові дорослої людини та тварин юні нейтрофіли не завжди вдається виявити.</p>	
<p>Паличкоядерні нейтрофіли. Характеризуються трансформацією ядра в ковбасоподібну або паличкоподібну форму. Ядро нерівномірно забарвлене в темно-фіолетовий колір, приблизно однакового діаметра по всій довжині, але може бути зігнуте у вигляді дужки, півмісяця, латинської букви S, на кінцях булавоподібно роздуге; в окремих місцях на ядрі помітні невеликі перехоплення-містки шириною не менше 1/2 основної частини ядра. Цитоплазма блідо-рожевого кольору, з азурофільною</p>	

Продовження таблиці 2.1

Морфологічний опис	Зображення
зернистістю, містить безліч дрібних (часто погано видимих), рівномірно розташованих гранул.	
Сегментоядерні нейтрофіли. Відрізняються від паличкоядерних лише характером ядра, яке складається з двох - п'яти і більше сегментів, з'єднаних тонкими, іноді ледь помітними перемичками. Ядро забарвлюється нерівномірно в темно-фіолетовий колір.	
Лімфоцити. За розміром поділяють на малі (6 - 9 мкм), середні (10 – 14 мкм) і великі (14 мкм і більше). Домінуючий компонент лімфоцита, ядро, округлої або злегка овальної форми, інтенсивно забарвлене в темно-синій колір. Хроматин розподілений таким чином, що більш темні ділянки переходять без різкого розмежування в світліші. Цитоплазма світло-синя, зазвичай з перинуклеарною зоною (просвітлення навколо ядра), іноді в ній виявляють азурофільну зернистість. Найбільше в периферичній крові виявляють малі лімфоцити (до 95%), у яких цитоплазма розташована у вигляді вузького обідка, або «серпа», навколо темного ядра.	
Моноцити. Це великі клітини діаметром 12 - 24 мкм, округлої або нерідко неправильної форми. Ядро характеризується різноманітністю форми: може бути бобоподібним, округлим, підковоподібним; забарвлюється нерівномірно в слабкофіолетовий колір з темно-фіолетовими плямами, так як хроматин ядра пухкий, розподілений нерівномірно, як би утворюючи осередки різних розмірів і форми. Цитоплазма моноцитів сіро-блакитного, сіро-синюватого кольору, поблизу від ядра містить дрібну пилеподібну зернистість.	

Продовження таблиці 2.1

Морфологічний опис	Зображення
<p>Плазматичні клітини. Дані клітини є кінцевим етапом розвитку В- лімфоцитів. На препараті це великі овальні клітини з базофільною цитоплазмою, що пов'язано з великою кількістю в них елементів гранулярних ендоплазматичної мережі. Розташований близько ядра комплекс Гольджі і центріолі займають ділянку, який на звичайних гістологічних препаратах має бліде забарвлення. Ядро плазматичної клітини синього кольору, сферичне, ексцентрично розташоване, містить компактний гетерохроматин у вигляді великих грудочок, що чергуються зі світлими ділянками приблизно однакових розмірів. Така конфігурація нагадує циферблат годинника, на якому скупчення гетерохроматину відповідають цифрам.</p>	

2.2.2. Розрахунок лейкограми. Лейкограма (лейкоцитарна формула) - це співвідношення різних морфологічних форм лейкоцитів, виражене у відсотках.

В основі методики лежить здатність суміші основних (азур) і кислих барвників (водорозчинний жовтий еозин) фарбувати елементи клітин крові в різні кольори і відтінки. Погане приготування мазка призводить до нерівномірного розподілу лейкоцитів і дає при підрахунку неправильне співвідношення їх окремих популяцій. У товстому мазку формені елементи крові важко помітні. Підрахунок лейкоцитарної формули крові здійснюють за допомогою світлового мікроскопа при імерсійному збільшенні об'єктива $\times 90$ (або при збільшенні об'єктива $\times 20$ і окулярі $\times 10$). Рахують всі лейкоцити, що зустрічаються в полі зору (всього 200 клітин), розподіляючи їх в окремі

популяції з урахуванням величини клітин, форми і забарвлення ядра і цитоплазми. Для зручності використовують гематологічний лічильник, або роблять це на аркуші паперу. Маючи на увазі те, що великі форми клітин (моноцити, нейтрофіли, мієлобласти та ін.) розміщуються більше по периферії, вздовж верхнього і нижнього країв мазка, а дрібніші (лімфоцити, мікромієлобласти) - ближче до центра, клітини підраховують завжди за однією і тією ж системою. Спочатку половину клітин рахують по одному поздовжньому боку мазка, а другу половину - по протилежному. Рахують за зигзагом: 3–4 поля зору по краю мазка, потім 3 - 4 поля зору під прямим кутом до середини мазка, потім продовжують рахунок у 3 - 4 полях зору паралельно краю мазка і знову повертаються до краю мазка, рахуючи також 3–4 поля. Такий рух під час підрахунку триває доти, доки не підрахують половину клітин, а потім переходять на протилежний бік, де підраховують другу половину клітин. Результати виражають у вигляді таблиці, де показаний відсоток певного виду лейкоцитів відносно інших (табл. 2.2) [7].

Таблиця 2.2.

Лейкоцитарна формула крові мишей, %

Базофіли	Еозинофіли	Нейтрофіли			Лімфоцити	Моноцити
		Юні	Паличко- ядерні	Сегменто- ядерні		
0,2-0,3	0-4,4		0-4,8	16,9-36,7	53,0-74,8	2,4-9,4

РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

3.1. Стан лейкограми у мишей контрольної групи

Відомо, що лейкограма є відображенням функціонального стану організму в цілому та імунної системи зокрема. Ми визначали показники лейкограми мишей контрольної групи на різних фазах експерименту. Зауважимо, що тварини контрольної групи не були інтактними. З ними проводились маніпуляції (фізичні тренування), але замість інтерферону їм вводили фізіологічний розчин у відповідній кількості. Отримані під час проведення експерименту показники співвідношення лейкоцитів (лейкограми) контрольної групи мишей наведено в таблиці 3.1 та на рисунку 3.1.

Таблиця 3.1

Стан лейкограми у мишей контрольної групи

Період експерименту	Група	Базофіли	Еозинофіли	Нейтрофіли			Лімфоцити	Моноцити
				Юні	Паличко-ядерні	Сегментно-ядерні		
1	К 1	-	-	4	2	22	69	3
2	К 2	-	-	2	6	43	44	5
3	К 3	-	-	2	4	25	64	5
норма		0-2	0-4	1-5	0-5	17-36	53-75	2-9

Як можна бачити, співвідношення клітин базофілів, еозинофілів, нейтрофілів, лімфоцитів та моноцитів у першій та третій групах (відповідають першому та третьому етапам експерименту) відповідає показникам норми.

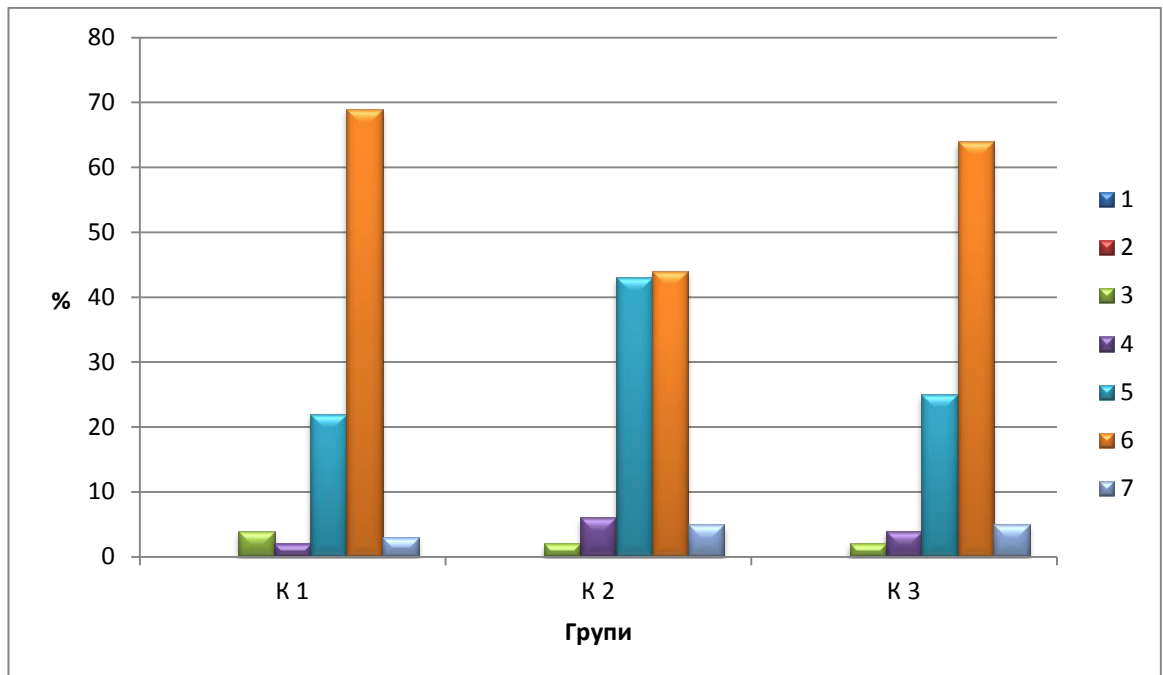


Рис. 3.1. Відсоткове співвідношення лейкоцитів у контрольній групі мишей на різних етапах експерименту

Примітка: 1 – базофіли; 2 – еозинофіли; 3 – юні нейтрофіли; 4 – паличкоядерні нейтрофіли; 5 – сегментоядерні нейтрофіли; 6 – лімфоцити; 7 – моноцити.

У мишей контрольної група на четвертому тижні фізичних тренувань (К 2) співвідношення лейкограми дещо змінилося. Кількість клітин базофілів, еозинофілів, юних нейтрофілів та моноцитів відповідала нормальним показникам. Натомість паличкоядерні та сегментоядерні нейтрофіли у контрольній групі на другому етапі дослідження були вище норми на 20%, а кількість лімфоцитів у цій групі мають показники нижче норми на 16%.

Таким чином, миші контрольної групи мали певну реакцію на фізичне навантаження в середині експериментального дослідження, яка проявилася у збільшенні фагоцитуючих клітин та зменшенні лімфоцитів (ефекторних клітин).

3.2. Стан лейкограми у мишей експериментальної групи

Для досягнення мети експерименту ми провели розрахунки лейкограми у мишей експериментальних груп в умовах експериментального дослідження. Узагальнені результати представлено у таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

Стан лейкограми у мишей експериментальної групи.

Період експерименту (тижні)	Група	Базофіли	Еозинофіли	Нейтрофіли			Лімфоцити	Моноцити
				Юні	Паличко-ядерні	Сегменто-ядерні		
1 (2 тиж)	I	1,7	2,5	0,0	16,7	16,7	55,8	6,7
	II	1,6	0,8	1,6	16,4	18,0	56,6	4,9
	III	0,6	0,0	3,7	35,4	39,0	17,7	3,7
	IV	2,9	0,0	3,6	25,0	28,6	37,9	2,1
	V	1,8	0,0	1,8	7,3	9,1	70,0	10,0
2 (4 тиж)	I	0,9	1,8	1,8	9,7	11,5	64,6	9,7
	II	0,0	0,0	5,8	29,2	35,1	27,3	2,6
	III	3,5	0,0	5,0	24,1	29,1	35,5	2,8
	IV	1,4	0,7	4,1	27,4	31,5	31,5	3,4
	V	0,0	0,0	1,3	35,4	36,7	25,9	0,6
3 (6 тиж)	I	0,8	2,0	4,0	27,4	31,0	34,1	0,8
	II	0,3	0,3	1,9	34,0	35,9	24,0	3,5
	III	0,3	0,0	5,4	26,5	32,0	32,0	3,7
	IV	0,7	0,3	4,6	29,4	34,1	29,2	1,7
	V	0,9	0,0	2,2	35,0	38,1	20,3	3,4
норма		0-2	0-4	1-5	0-5	17-36	53-75	2-9

Розрахунки проводились наприкінці другого тижня від початку експерименту з фізичним тренуванням мишей (період 1), наприкінці четвертого тижня від початку тренувань (період 2) та наприкінці 6 тижня (період 3).

Узагальненні данні за показниками лейкограми на першому етапі дослідження представлені на рис. 3.2.

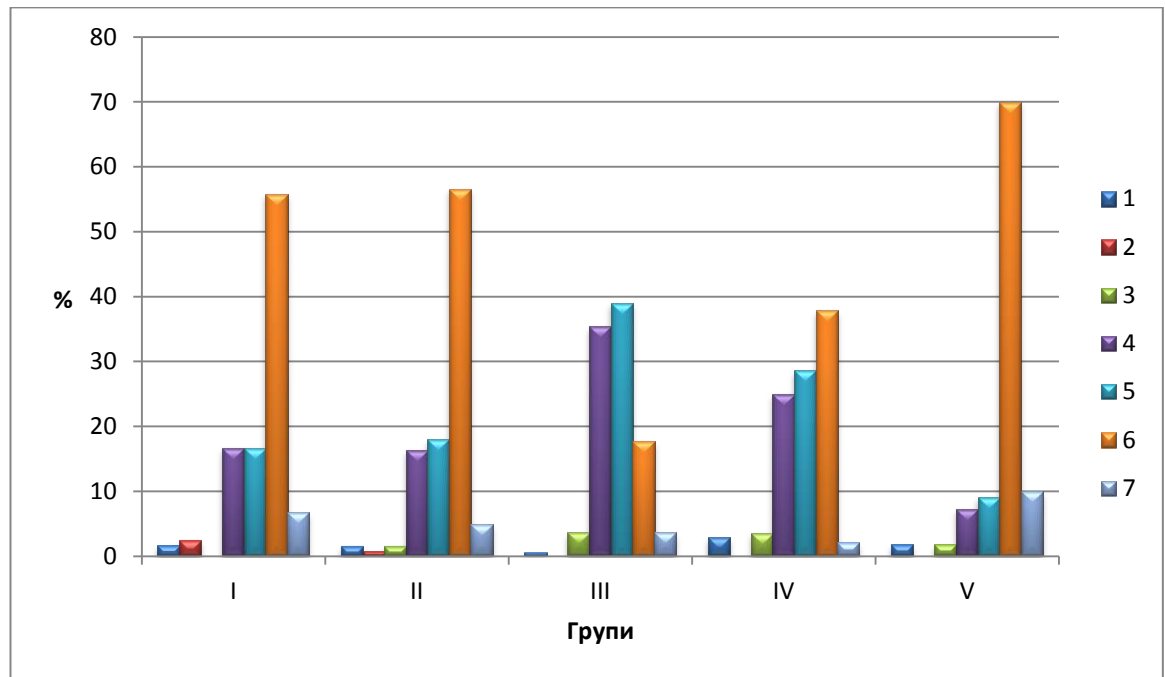


Рис. 3.2. Показники лейкограми мишей експериментальних груп на першому етапі дослідження, %

Примітка: 1 – базофіли; 2 – еозинофіли; 3 – юні нейтрофіли; 4 – паличкоядерні нейтрофіли; 5 – сегментоядерні нейтрофіли; 6 – лімфоцити; 7 – моноцити.

Нами з'ясовано, що показники еозинофілів та юних нейтрофілів не відрізнялися від нормальних показників в усіх досліджуваних групах.

Ми з'ясували, що рівень базофілів виріс у 4 досліджуваній групі (2.9%). Також змінилися показники кількості сегментоядерних нейтрофілів: вони зменшилися відносно нормальних показників у 1 та 5 експериментальних групах. Показники кількості лімфоцитів відносно нормальних різко знизилась у 3 та 4 експериментальних групах

(відповідно, 17,7% та 37,9%). Кількість моноцитів незначно зросла тільки у 5 експериментальній групі (що може бути артефактом дослідження).

Найбільш цікавими виявились результати по кількості паличкоядерних нейтрофілів їх кількість різко зросла у 1 та 4 експериментальних групах незначно зросла у 5 експериментальній групі, при чому зростання було від 300% до 500% і вище. Такі зміни свідчать про те, що інтерлейкін-2, як прозапальний цитокін, викликає різке пришвидшення нейтрофілопоезу, що відображається в появі у периферичній крові великої кількості молодих форм нейтрофілів.

Циклоспорин, який ми вводили мишам першої експериментальної групи є інгібітором інтерлейкіну-2. Ми бачимо, що введення цього інгібітора не спровокувало сильного зростання кількості паличкоядерних нейтрофілів. Якщо порівняти результати із результатами контрольної групи виявляється що зростання кількості молодих форм нейтрофілів є реакцією на фізичне навантаження. Але введення інтерлейкіну-2 різко підсилює таку реакцію, особливо при введенні середніх та високих доз препарату.

Одночасно ми можемо бачити тенденцію до зниження кількості лімфоцитів у мишей 3 та 4 груп, що може свідчити про здатність інтерлейкіну-2 пригнічувати лімфопоез.

Показники лейкограми досліджуваних тварин наприкінці 4 тижня експерименту (2 період) наведено на рис. 3.3.

Другий етап дослідження відповідає кінцю 4 тижня введення інтерлейкіну-2 та циклоспорину і продовженню фізичних тренувань. Як і у 1 періоді кількість еозинофілів практично не змінилася і відповідала нормальним показникам.

Кількість базофілів у 1, 2, 4 і 5 експериментальних групах теж не відрізнялась від нормальних показників. Натомість у третій експериментальній групі вона зросла.

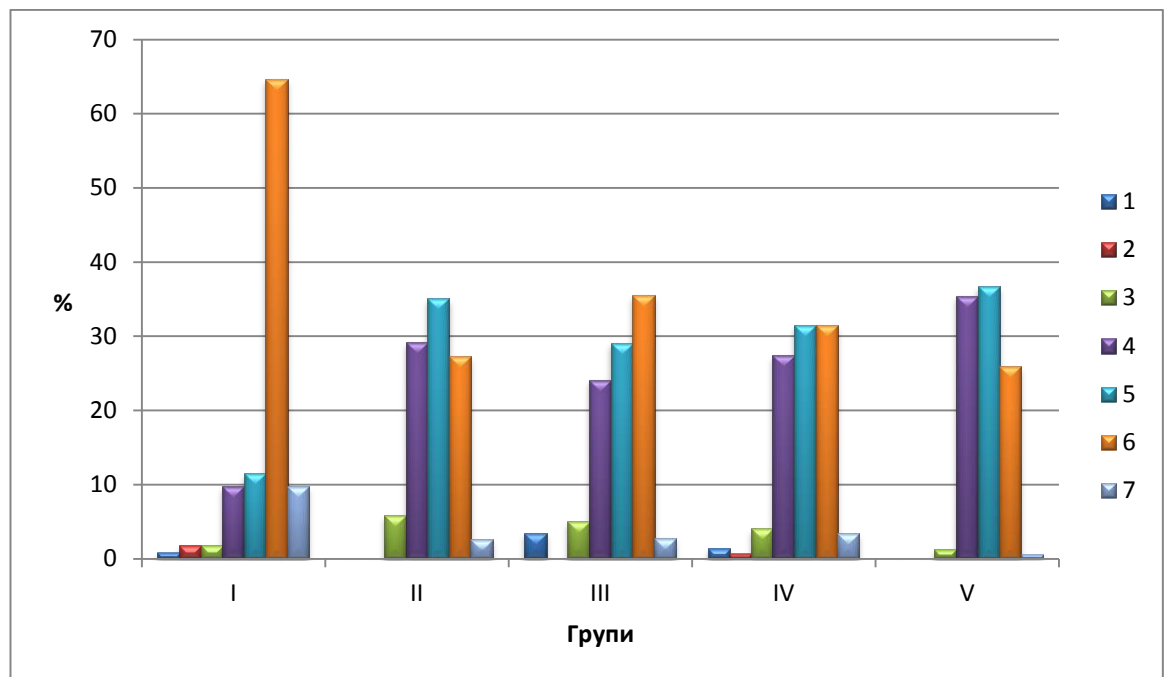


Рис. 3.3. Показники лейкограми мишей експериментальних груп на другому етапі дослідження, %

Примітка: 1 – базофіли; 2 – еозинофіли; 3 – юні нейтрофіли; 4 – паличкоядерні нейтрофіли; 5 – сегментоядерні нейтрофіли; 6 – лімфоцити; 7 – моноцити.

Кількість моноцитів не значно збільшилась у тварин першої експериментальної групи а у тварин п'ятої експериментальної групи суттєво зменшилась (0.6%).

В 2-4 групах кількість моноцитів відповідала нормальним показникам хоча і була ближче до нижньої межі норми.

Особливо помітні зміни були у співвідношенні кількості нейтрофілів, так, у першому періоді різко зростала кількість молодих форм нейтрофілів. При чому, у другій та третій експериментальних групах збільшилась кількість юних нейтрофілів, чого не було у першому періоді дослідження. Кількість паличкоядерних нейтрофілів була вище за норму в усіх досліджуваних групах. Найменше зростання ми виявили у групі, де тваринам вводили циклоспорин. В другій, третій і четвертій

експериментальних групах кількість нейтрофілів зростає приблизно в 5 і більше разів незалежно від дози інтерлейкіну-2.

Кількість зрілих форм нейтрофілів також змінилась, їх було менше в 1 експериментальній групі але несподівано їх кількість збільшилась у 5 експериментальній групі. Кількість лімфоцитів, як і у 1 періоді була нижче ніж норма, що свідчить про пригнічення їх проліферації інтерлейкіном-2. Нормальною кількістю лімфоцитів була тільки у 1 експериментальній групі, де дія ІЛ-2 була пригнічена циклоспорином.

На завершальному етапі експерименту (6 тижень) ми також провели розрахунки лейкоцитарної формули для тварин досліджуваних груп (рис. 3.4).

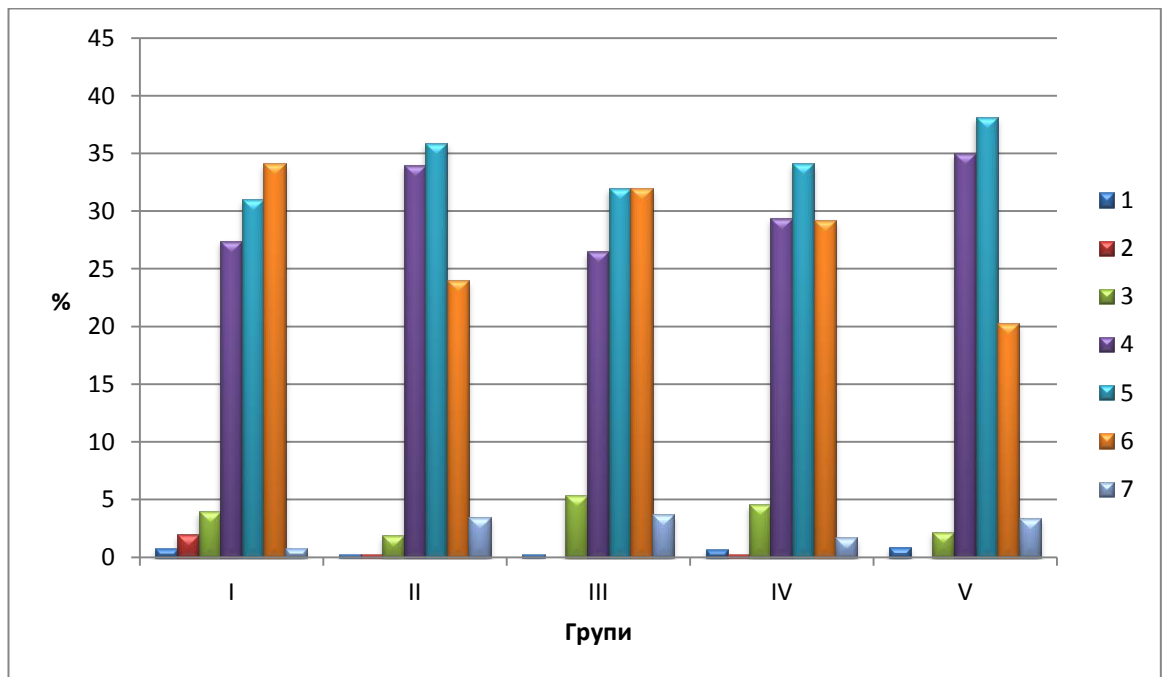


Рис. 3.4. Показники лейкограми мишей експериментальних груп на третьому етапі дослідження, %.

Примітка: 1 – базофіли; 2 – еозинофіли; 3 – юні нейтрофіли; 4 – паличкоядерні нейтрофіли; 5 – сегментоядерні нейтрофіли; 6 – лімфоцити; 7 – моноцити.

Було з'ясовано, що показники кількості базофілів та еозинофілів не відрізнялися від нормальних в жодній із досліджуваних груп. Це може

свідчити про те, що прозапальний цитокін інтерлейкін-2 не впливає на проліферацію базофілів та еозинофілів, що підтверджується нашими даними. Кількість моноцитів відповідала нормальним показникам у 2, 3 та 5 експериментальних групах, натомість у 1 та 4 групах вона була менше норми.

Аналізуючи отримані дані ми можемо стверджувати, що тенденція до збільшення молодих форм нейтрофілів та зменшення кількості лімфоцитів продовжується і наприкінці експерименту. В 3 експериментальній групі дещо збільшилась кількість юних нейтрофілів але дуже незначно. Це свідчить про те, що незрілі форми нейтрофілів виходять в периферичну кров в дуже обмеженій кількості, отже інтерлейкін-2 не викликає патологічних форм нейтрофілопоезу. Як і у попередні тижні кількість паличноядерних нейтрофілів залишилась в середньому в 5 разів вище за нормальні показники в усіх досліджуваних групах, при чому навіть циклоспорин у 1 групі не мав пригнічуючого ефекту на інтерлейкін 2 на відміну від 1 та 2 етапу досліджень. Кількість сегментоядерних нейтрофілів незначно зросла тільки у 5 експериментальній групі, а в інших відповідала нормі, наближаючись до її верхньої межі. Кількість лімфоцитів залишалась приблизно в 2 рази меншою за нормальні показники (причому це спостерігалось в усіх досліджуваних групах).

Отже можна стверджувати, що вплив інтерлейкіну-2 на лейкоцити мишей є значним. Ми зафіксували пригнічення проліферації лімфоцитів при чому це явище наростало по мірі експерименту. Також показано, що інтерлейкін-2 викликає різке посилення проліферації нейтрофілів. Ми спостерігали її збільшення протягом всього експерименту, при чому зростання склало від 300-700%. Також зафіксовано дозозалежний вплив інтерлейкіну-2.

Також ми проаналізували динаміку змін лейкограми в кожній із досліджуваних груп за періодами. Такий аналіз дозволяє побачити яким

чином змінювалась лейкограма протягом всього періоду експерименту. Першими ми проаналізували результати по групі мишей які отримували інгібітор інтерлейкіну-2 – циклоспорин. Результати наведені на рис. 3.5.

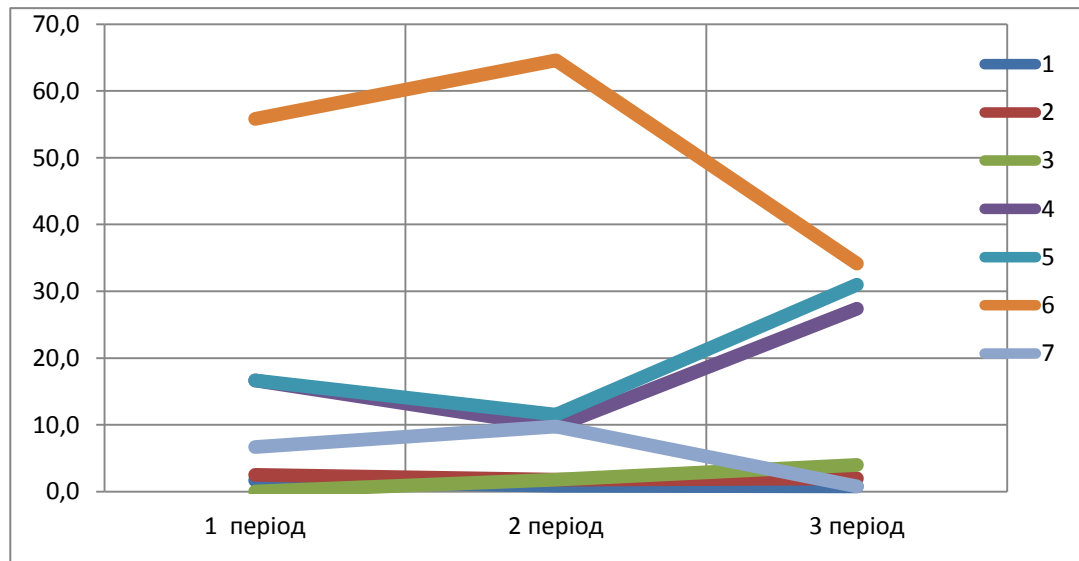


Рис. 3.5. Динаміка змін показників лейкограми мишей першої експериментальної групи, %

Примітка: 1 – базофіли; 2 – еозинофіли; 3 – юні нейтрофіли; 4 – паличкоядерні нейтрофіли; 5 – сегментоядерні нейтрофіли; 6 – лімфоцити; 7 – моноцити.

Найменших змін протягом всього експерименту зазнала кількість базофілів еозинофілів та юних нейтрофілів. Кількість юних нейтрофілів трохи збільшилась наприкінці експерименту. Кількість моноцитів утримувалась приблизно однаковою на 1 та 2 періоді, натомість наприкінці експерименту їх кількість різко зменшилась. Найбільш значних змін зазнали паличкоядерні та сегментоядерні нейтрофіли та лімфоцити. Нейтрофіли продемонстрували схожу тенденцію: незначне зменшення у 2 періоді відносно 1 та різке зростання кількості у 3 періоді. Лімфоцити навпаки зростали від 1 до 2 періоду але наприкінці експерименту їх кількість різко зменшилась.

Таким чином вплив циклоспорину практично не впливає на базофіли, еозинофіли та юні нейтрофіли. Тривале введення гальмує

вироблення моноцитів. Також тривале введення різко збільшує вироблення паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів і різко пригнічує вироблення лімфоцитів.

Результати дослідження динаміки змін лейкоцитарної формули в умовах дії інтерлейкіну-2 у концентрації 5000 мо/кг представлено на рис. 3.6.

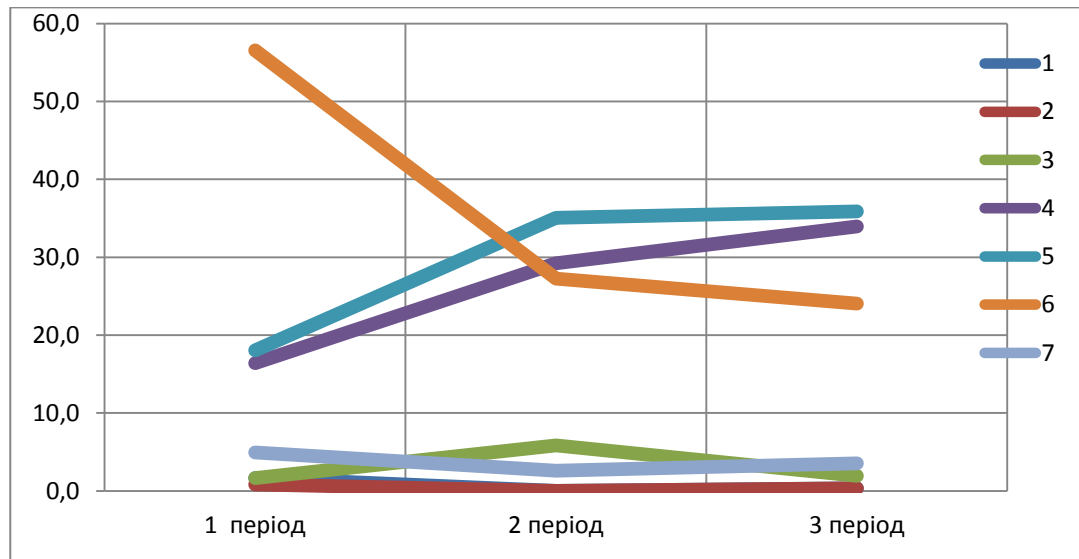


Рис. 3.6. Динаміка змін показників лейкограми мишей другої експериментальної групи, %

Примітка: 1 – базофіли; 2 – еозинофіли; 3 – юні нейтрофіли; 4 – паличкоядерні нейтрофіли; 5 – сегментоядерні нейтрофіли; 6 – лімфоцити; 7 – моноцити.

Як можна бачити введення інтерлейкіну в малих дозах не впливає на кількість базофілів та еозинофілів. Кількість юних нейтрофілів незначно зростає у 2 періоді дослідження а на 3 практично повертається до показників 3 періоду. Кількість моноцитів навпаки у 2 періоді дещо знижується а на 3 повертається до показників 1 періоду. Як і у попередній групі найбільші зміни стосувались паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів і лімфоцитів. У порівнянні з першим періодом кількість сегментоядерних та паличкоядерних нейтрофілів різко збільшилась що доводить стимулюючий вплив інтерлейкіну-2 на ці

клітини. Натомість кількість лімфоцитів стрімко знижувалась протягом експерименту, при чому дуже різко від 1 до 2 періоду і менше до 3.

Розглянемо динаміку змін лейкограми у групі тварин, які отримували інтерлейкін-2 у концентрації 7500 мо/кг представлені на рис. 3.7.

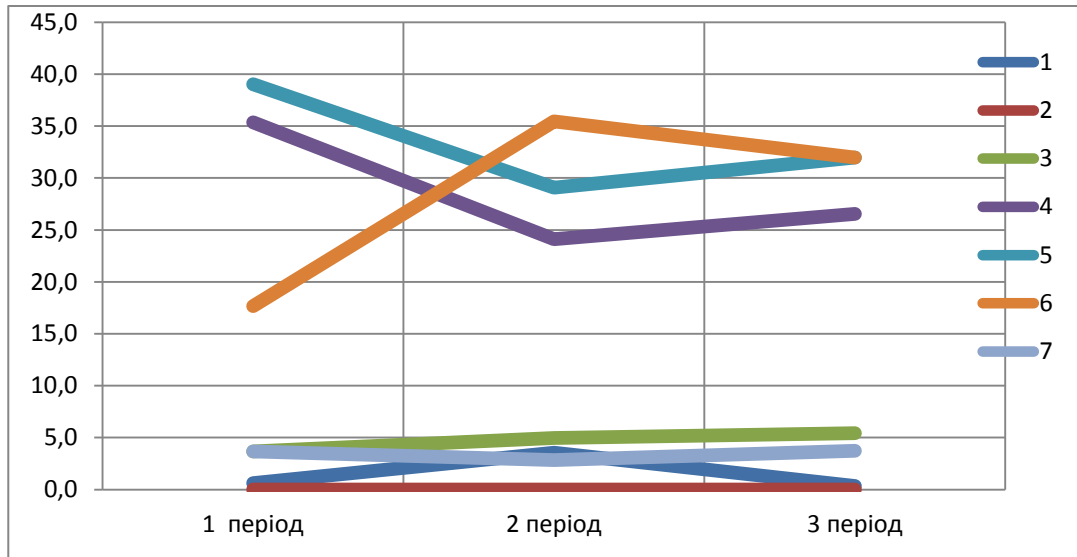


Рис. 3.7. Динаміка змін показників лейкограми мишей третьої експериментальної групи, %

Примітка: 1 – базофіли; 2 – еозинофіли; 3 – юні нейтрофіли; 4 – паличкоядерні нейтрофіли; 5 – сегментоядерні нейтрофіли; 6 – лімфоцити; 7 – моноцити.

Як і у попередніх групах кількість еозинофілів не змінилася протягом експерименту. Кількість базофілів незначно зростала у 2 періоді повертаючись до показників 1 наприкінці експерименту. Співвідношення кількості моноцитів практично не змінювалась протягом всього експерименту.

Аналізуючи показники кількості нейтрофілів можна зробити наступні висновки: середня доза інтерлейкіну-2 спричинила незначне збільшення кількості юних нейтрофілів наприкінці експерименту. Кількість сегментоядерних та паличкоядерних нейтрофілів демонструвала подібну одна до одної тенденцію різке підвищення у 1

періоді, зниження у 2 та незначне підвищення у 3. Кількість лімфоцитів, навпаки, була сильно зменшеною у 1 періоді, зроста майже до нормальних величин у 2 періоді та повторно знизилась у 3 періоді.

Динаміка змін лейкограми у групі тварин, які отримували інтерлейкін-2 у концентрації 30000 мо/кг представлена на рис. 3.8.

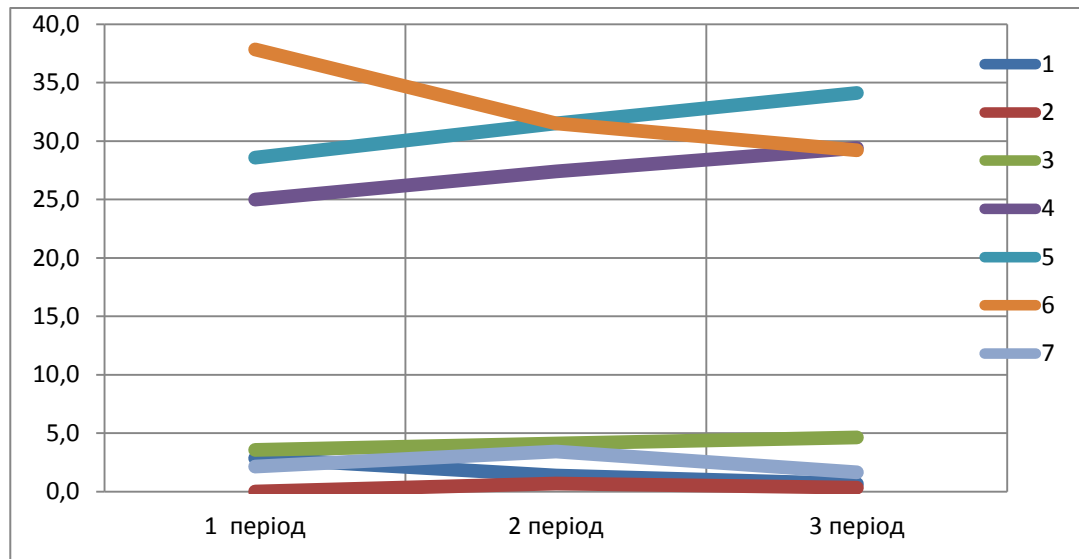


Рис. 3.8. Динаміка змін показників лейкограми мишей четвертої експериментальної групи, %

Примітка: 1 – базофіли; 2 – еозинофіли; 3 – юні нейтрофіли; 4 – паличкоядерні нейтрофіли; 5 – сегментоядерні нейтрофіли; 6 – лімфоцити; 7 – моноцити.

Як можна бачити з графіків, кількість еозинофілів не змінювалась протягом експерименту. Кількість базофілів дещо зменшилась від першого періоду до третього. Моноцити незначно зростали у другому періоді дослідження а у третьому їх кількість зменшилась. Кількість юних нейтрофілів незначно зростала протягом експерименту. Кількість паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів продемонструвала зростання протягом всіх тижнів експерименту. Кількість лімфоцитів на першому етапі була значно нижче норм і продовжила різке падіння протягом всіх тижнів експериментального дослідження.

Результати 5 експериментальної групи представлені на рис. 3.9.

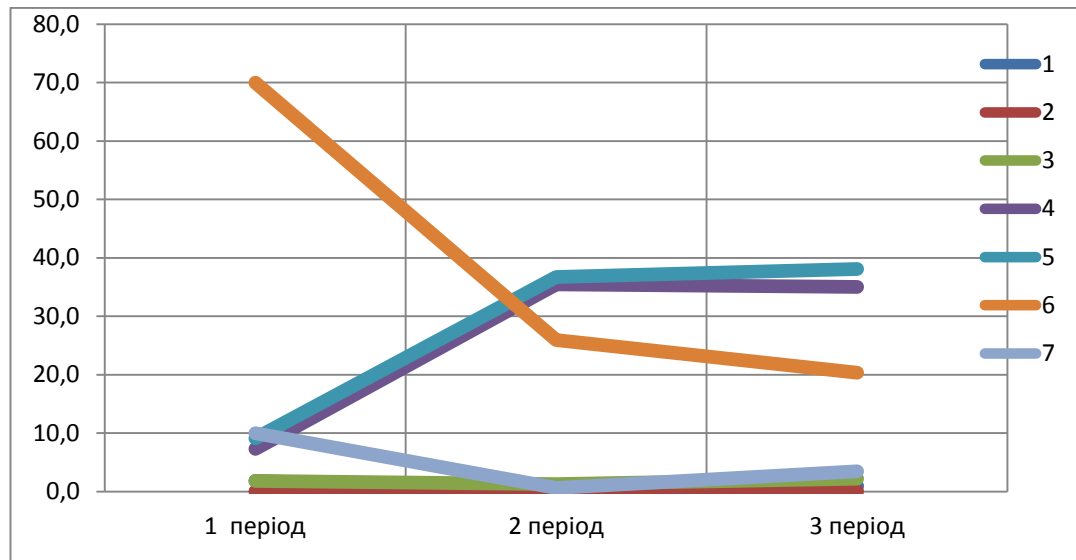


Рис. 3.9. Динаміка змін показників лейкограми мишей п'ятої експериментальної групи, %.

Примітка: 1 – базофіли; 2 – еозинофіли; 3 – юні нейтрофіли; 4 – паличкоядерні нейтрофіли; 5 – сегментоядерні нейтрофіли; 6 – лімфоцити; 7 – моноцити

З'ясовано, що кількість базофілів еозинофілів та юних нейтрофілів не зменшилась протягом всього періоду експерименту. Кількість моноцитів зменшилась у 2 періоді відносно 1 а потім незначно зросла до кінця експерименту. Кількість сегментоядерних та паличкоядерних нейтрофілів продемонструвала різке зростання від 1 до 2 періоду а потім незначно збільшилась до 3 періоду. Вміст лімфоцитів різко зменшився за весь період дослідження.

Таким чином ми з'ясували, що інтерлейкін-2 має дозозалежний вплив на показники лейкограми білих мишей. Також можна зробити висновок про особливості такого впливу в залежності від тривалості введення препарату та фізичної активності мишей.

ВИСНОВКИ

1. Інтерлейкін-2 є одним з найважливіших цитокінів, він контролює проліферацію та диференціювання Т-залежних клітин. Він необхідний для нормально функціонування Т-клітин, а при нестачі ІЛ-2 або порушенні зв'язку з рецептором спостерігається дефіцит регуляторних Т-клітин, це може стати причиною аутоімунних реакцій.
2. З'ясовано, що у мишей контрольної групи, які мали фізичне навантаження, але не знаходились під впливом інтерлейкіну-2 спостерігається незначне зниження кількості ефекторних клітин та збільшення фагоцитів.
3. Показано, що у мишей експериментальної групи відбулися зміни лейкограми. Інтерлейкін-2 в жодній концентрації не впливає на кількість еозинофілів, базофілів та викликає незначне коливання кількості юних нейтрофілів. У групі, якій вводили ІЛ-2 у концентрації 5000 мо/кг кількість сегментоядерних та паличкоядерних нейтрофілів різко збільшилась, що свідчить про те, що інтерлейкін-2 має стимулюючий вплив на ці клітини. У групі, яка отримувала ІЛ-2 у концентрації 7500 мо/кг також кількість паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів різко збільшується, а кількість лімфоцитів зросла майже до нормальних показників. При введенні ІЛ-2 з концентрацією 30000, спостерігалось зростання кількості всіх нейтрофілів та моноцитів, а кількість лімфоцитів при цьому різко спадає. Інтерлейкін-2 має дозозалежний та залежний від тривалості уведення та фізичної активності вплив на показники лейкограми білих мишей.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Белозеров Е.С. Болезни иммунной системы. – Элиста:АПП «Джангар», 2005 - 267 с.
2. Бережная Н.М. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли. Клетки и цитокины — участники воспаления. Онкология, 2009. 11(1): 6–17.
3. Бесчасний С. П. Імунологія: навч. посіб. / С. П. Бесчасний, О. М. Гасюк – Херсон: ФОП Вишемирський В. С., 2019. – 196 с.
4. Біловол О.М., Кравчун П.Г.,Бабадран В.Д., Кузнецова Л.В. Клінічна
5. Вебер В.Р. Лабораторные методы исследования. Диагностическое значение: Учебное пособие. [Текст] / В.Р. Вебер, Т.П. Швецова. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство». – 2008. – 496 с.
6. Гасюк, О.М. Клітинні основи кровотворення : навч.-метод. посіб. / О. М. Гасюк – Херсон : ФОП Вишемирський В. С., 2019. – 92 с.
7. Западнюк П. И. Лабораторные животные, Разведение, содержание, использование в эксперименте: учебное пособие [Текст] / И. П. Западнюк, И. В. Западнюк, Е. А. Захария, Б. В. Западнюк – 3-е изд. перераб. и доп. – Киев: Вища школа. Головное изд-во, 1983. – 383 с.
8. Запорожан, В.М. Морфологія клітин крові лабораторних тварин і людини [Текст] / В.М. Запорожан, В.К. Напханюк, Н.О. Горянова та ін. - Одеса: Изд-во. Одес.держ. мед. ун-т, 2002. - 118 с.
9. Імунологія: Підручник / Кохан І. — Київ-Торонто: Кобза, 1994. — 442 с.
10. Імунологія: підручник / Л. В. Кузнецова, В. Д. Бабаджан, Н. В. Харченко [та ін.]; за ред. Л. В. Кузнецова, В. Д. Бабаджан, Н. В. Харченко. — Вінниця: ТОВ «Меркьюрі Поділля», 2013. — 564 с.

- 11.Іонов І.А. Сучасна імунологія (курс лекцій) / І.А. Іонов, Т.Є. Комісова, О.М. Сукач, О.О. Катеринич О Х.: ЧП Петров В.В., 2017. - 107 с.
- 12.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-plavatelnyim-testam-s-nagruzkoj>
- 13.Каркищенко Н.Н. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [Текст] / Н.Н.Каркищенко, С.В.Грачева. - М.:Профиль–2С, 2010. – 358 с.
- 14.Кашкин П.К. (1999) Цитокины иммунной системы: основные свойства и иммунобиологическая активность. Клин. лаборат. диагностика, 11: 21–32.
- 15.Кетлинский СС, Симбирцев АС. Цитокины. Москва: Фолиант; 2008. 552 с.
- 16.Клінічна імунологія та алергологія // Навчальний посібник за редакцією: член-кор. АМНУ, д.м.н., проф. О.М. Біловола, д.м.н., проф. П.Г. Кравчуна, д.м.н., проф. В.Д. Бабаджана, д.м.н., проф. Л.В. Кузнецової) – Харків “Гриф”, 2011.
- 17.Клінічна імунологія та алергологія. – Х.: «Гриф», 2011.- 550 с.
- 18.Клінічна та лабораторна імунологія. Національний підручник / За ред. Кузнецової Л. В., Бабаджана В. Д., Фролова В. М.- Київ: Поліграф плюс, 2012. — 922 с.
- 19.Кузнецова Л.В., Бабаджан В.Д., Фролов В.М., та інші. Клінічна та лабораторна імунологія. - Національний підручник //За загальною

- редакцією доктора медичних наук, професора Кузнецової Л.В., доктора медичних наук, професора Бабаджана В.Д., доктора медичних наук, професора Фролова В.М. – К.ООО.: “Полиграф плюс”. - Київ. - 2012. – 922 с.
20. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник для студ. вищ. мед. навч. заклад / за редакцією В. П. Широбокова / видання 2-е. — Вінниця: нова книга, 2011. — 952 с.
21. Мікробіологія з основами імунології: підруч. для вищ. мед. навч. закл. 3-4-го рівнів акред. / В. В. Данилейченко, Й. М. Федечко, О. П. Корнійчук. — 2-е вид., перероб. та допов. — К. : Медицина, 2009. — 392 с.
22. Общая иммунология: Учеб. пособие / Вершигора А. Е. — К.: Вища шк., 1990. — 736 с.
23. Ованесян ИГ. Современные представления о роли цитокинов в гомеостазе. Научно-медицинский журнал. 2006;4:8-17.
24. Орадова АШ, Устенкова ГО, Стабаева ГС. Методы исследования цитокинов (обзорная статья). Medicine. 2014;10:84-87.
25. Основи імунології / Р. П. Маслянюк. — Львів: Вертикаль, 1999. — 472 с.
26. Прикладная иммунология /Под ред. А. А. Сохина, Е. Ф. Чернушенко.— К.: Здоровье, 1984. — 320 с.
27. Серебренникова С.Н., Семинский И.Ж. (2008) Роль цитокинов в воспалительном процессе. Сиб. мед. журн., 6: 5–8.
28. Симбирцев АС. Цитокины – новая система регуляции защитных реакций организма. // Цитокины и воспаление. 2002;1:9-16.
29. Симбирцев АС. Цитокины: классификация и биологические функции. // Цитокины и воспаление. 2004;3(2):16-22.
30. Скок М. В. Основи імунології : курс лекцій / М. В. Скок. – Київ :

- 31.Соколенко В.Л., Соколенко С.В. Прикладна імунологія. Навчально-методичний посібник – Черкаси: Вид. від. ЧНУ ім. Богдана
- 32.Фролов О. К. Основи імунології : конспект лекцій для студентів напряму біологія. / Фролов О.К. – Київ . – 2012. – 231 с.
- 33.Хаитов Р.М. Иммунология : Учебник. / Р.М. Хаитов, Г.А. Игнатъева, И.Г. Сидорович. - Москва: Медицина; 2000. - 432 с.
- 34.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.
- 35.Швец В. А. Участь цитокінів в адаптації до фізичного навантаження / В. А. Швец // Альманах науки. – 2019. – № 6/1 (27). – С. 4-6.
- 36.Швец В. А. Участь цитокінів у адаптаційних реакціях (огляд літератури) / В. А. Швец, О. М. Гасюк // Природничий альманах (біологічні науки). Вип. 27. – Херсон: ФОП Вишемирський В. С., 2019. – С. 145-161.
- 37.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.
- 38.Шипилов МВ. Молекулярные механизмы “цитокинового шторма” при остром инфекционных заболеваниях. // Лечебное дело. 2013;1:81-85.
- 39.Щокіна КГ. Досягнення та перспективи цитокінової та антицитокінової терапії / С.Ю. Штриголь, С.М.Дроговоз // Науковий журнал МОЗ України. 2013;1(2):121-129.

40. Імунологія / Якобісяк М. Пер. з польської за ред. проф. В. В. Чоп'як. — Вінниця: Нова книга, 2004. — 672 с.
41. Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol.* 2017;39:517-528.
42. Eric T. Boder. Protein engineering: Tighter ties that bind // *Nature.* V. 484. P. 463–464.
43. 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>