

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

**ПОВЕДІНКОВА АКТИВНІСТЬ БІЛИХ МИШЕЙ В УМОВАХ
ТРИВАЛОГО ВПЛИВУ РЕКОМБІНАНТНОГО ІНТЕРЛЕЙКІНУ-2**

**Кваліфікаційна робота (проект) на здобуття
ступеня вищої освіти «магістр»**

Виконала: студентка 211М групи

Спеціальності: 091 біологія

Освітньо – наукової програми Біологія

Дьяченко Надія Андріївна

Керівник к.б.н., доцент Гасюк О.М.

Рецензент к.б.н, професор Мойсієнко І.І.

Херсон - 2020

ЗМІСТ

ВСТУП	
РОЗДІЛ 1. Огляд літературних джерел	
1.1. Роль інтерлейкіну-2 в організмі людини.....	
1.2. Вплив інтерлейкіну-2 на нервову систему.....	
1.3. Роль інтерлейкіну-2 в процесах навчання і пам'яті	
1.4. Фізична активність та інтерлейкін-2...	
.....	
РОЗДІЛ 2. Організація та методи дослідження	
2.1. Організація дослідження.....	
2.2. Методика «Відкрите поле».....	
2.3. Тест примусового плавання (Порсольта).....	
РОЗДІЛ 3. Аналіз результатів власних досліджень	
3.1. Показники рухової активності та дослідницької	
поведінки дослідних груп мишей.....	
3.2. Емоційна реактивність, тривожність та стрес-	
реактивність досліджуваних мишей.....	
3.3. Показники фізичної працездатності в тесті примусового	
плавання «Порсольта» дослідних груп мишей.....	
ВИСНОВКИ	
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	

ВСТУП

Актуальність дослідження. Інтерлейкіни – це білкові сполуки, вони є частиною імунітету організмів. Інтерлейкін-2 може мати одночасний інтенсивний характер впливу на декілька фізіологічних систем – регулювання гомеостазу в імунній системі та мозку. Також цей інтерлейкін приймає важливу роль в реалізації імунної відповіді. Встановлено, що інтерлейкін-2 разом з інтерлейкіном-6 впливає на нервову систему та поведінкові прояви дослідних тварин. Відомо, що препарат рекомбінантного інтерлейкіну-2 має продуктивну дію при лікуванні імуносупресії, яка викликана соціальним хронічним стресовим ураженням, та володіє антидепресивним ефектом.

Таким чином вивчення теми «Поведінкова активність білих мишей в умовах тривалого впливу рекомбінантного інтерлейкіну-2» є актуальною на даний час. Також інтерлейкін-2 приймає участь в проліферації та диференціюванні Т-лімфоцитів, індукує лімфокін-активованні кіллери та бере участь у протипухлинному захисті. Крім всього перерахованого інтерлейкін-2 посилює секрецію інтерферону- γ Т-лімфоцитами. Та найважливіше, що інтерлейкін-2 формує ефективність захисних механізмів, які направлені на уникнення проліферації неотрансформованих клітин, наприклад, у хворих на гепатит (вірусний) в реплікативний період можна спостерігати високу спонтанну продукцію інтерлейкіну-2.

Зв'язок роботи з науковими планами, програмами і темами. Експериментальне дослідження дипломної роботи виконане в межах науково – дослідної ініціативної теми кафедри «Адаптаційні процеси організму в умовах цитокінового навантаження» (державний реєстраційний номер 0119U101093), керівник доцент Гасюк О.М. Магістерська робота виконувалася у межах дисертаційного дослідження аспірантки кафедри Швець В.А.

Мета дослідження – дослідити поведінку мишей в умовах тривалого впливу рекомбінантного інтерлейкіну-2.

Об'єкт дослідження – поведінкова активність білих мишей.

Предмет дослідження – поведінкові прояви, що характеризують співвідношення процесів збудження і гальмування у центральній нервовій системі мишей в умовах дії інтерлейкіну-2.

Завдання дослідження:

1. Розглянути основні відомості щодо ролі інтерлейкіну-2 в організмі людини;
2. Дослідити рухову активність і дослідницьку поведінку досліджуваних мишей під впливом інтерлейкіну-2;
3. Дослідити емоційну реактивність, тривожність та стрес-реактивність досліджуваних мишей під впливом інтерлейкіну-2;
4. Дослідити показники фізичної працездатності мишей під час примусового плавання в умовах дії інтерлейкіну-2.

Методи дослідження. Аналіз літературних джерел, моделювання, методики дослідження поведінкових проявів та вивчення поведінкової активності лабораторних тварин, методи статистичної обробки результатів дослідження.

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

Наукова новизна одержаних результатів. За результатами дослідження встановлено, що інтерлейкін-2 в різних концентраціях чинить неоднаковий вплив на поведінкові прояви дослідних тварин, що є підтвердженням його дозозалежності. Проаналізувавши дослідні показники поведінки тварин, відзначено також адаптаційні зміни в поведінці тварин під час тривалого фізичного навантаження.

Практичне значення одержаних результатів. Результати дослідження вказують на перспективність подальшого вивчення ефектів різних доз рекомбінантного інтерлейкіну-2 на нервову систему та організм в цілому, беручи до уваги розповсюджене застосування в медичній

практиці цього цитокіну. Одержані результати дослідження дозволяють оволодіти практичними навичками роботи в клінічній лабораторії.

Апробація результатів дослідження. Результати дослідження, викладені у кваліфікаційній роботі оприлюднено на VI Міжнародній заочній науково-практичній конференції «Актуальні питання біологічної науки»: Ніжин: НДУ імені Миколи Гоголя, 2020 (10.04.2020 року).

Структура роботи. Робота включає в себе вступ, огляд літературних джерел, викладення методик проведення дослідження, практичну частину, висновки та список літературних джерел. Містить 53 сторінки, 4 рисунки, та 3 таблиці.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1.1 Роль інтерлейкіну-2 в організмі людини

Інтерлейкін-2 (ІЛ-2) – фактор, який продукується зрілими Т-хелперами в результаті їх стимуляції антигеном. ІЛ-2 посідає важливе місце в системі інтерлейкінової регуляції імунітету, посилює процеси як клітинного, так і гуморального імунітету [6, 18, 53]. Під його впливом відбувається диференціація Т-лімфоцитів до Т-кілерів, що вбивають пухлинні й інфіковані мікроорганізмами клітини, а також активується продукція інтерферону- γ та фактору некрозу пухлин- α Т-клітинами та НК-клітинами. ІЛ-2 є глікопротеїном, що містить залишки сіалової кислоти; молекулярна маса ІЛ-2 в організмі людини – близько 13,5 Да. Також цей цитокін складається із 133 залишків амінокислот [5, 18, 35, 47].

Найбільша концентрація ІЛ-2 у крові спостерігається на 3-4 добу після антигенної стимуляції та зберігається протягом 12 днів. ІЛ-2 стимулює ріст і дозрівання самих Т-клітин і утворення ними лімфокінів, а також підвищує активність Т-кілерів, НК-клітин, еозинофілів, тромбоцитів, моноцитів [6, 18, 25, 45]. Також ІЛ-2 посилює проліферацію і дозрівання В-лімфоцитів, продукцію IgG, IgM та IgA. Серед інших валивих біологічних ефектів ІЛ-2 слід відмітити їх протиапоптичну й протипухлинну дію, а також здатність відміняти розвиток імунотолерантності [5, 20, 38].

ІЛ-2 – перший молекулярно-клонований цитокін, який відомий як найважливіший фактор росту Т-клітин, необхідний для їх проліферації і диференціювання. Подальші дослідження показали, що ІЛ-2 сприяє генерації, виживаємості і функціональній активності регуляторних Т-клітин Foxp3⁺ (Treg або Т-супресори). Foxp3 – транскрипційний фактор, що регулює транскрипцію генів, відповідальних за диференціювання Т-

клітин і експресію цитокінів. При відсутності ІЛ-2 спостерігається глибокий дефіцит Т-супресорів, що приводить до розвитку аутоімунних захворювань. Таким чином, ІЛ-2 має подвійні та протилежні функції: підтримка регуляторних Т-клітин, індукція ефektorних клітин, одночасний контроль і стимуляція імунних реакцій [8, 18, 38, 41].

Найбільш раннім терапевтичним застосуванням ІЛ-2 була стимуляція імунної відповіді у онкохворих. Не так давно з'явилися терапевтичні стратегії використання ІЛ-2, моноклональних антитіл до нього, застосування хімічних модифікацій ІЛ-2 для збільшення числа і функції клітин Treg з метою лікування аутоімунних захворювань [5, 20, 25]. Однак залишається актуальною проблема одночасної генерації ефektorних клітин і клітин пам'яті, природних кілерів та інших лімфоїдних популяцій при використанні в лікуванні ІЛ-2 [5, 18, 45].

ІЛ-2 необхідний для виживання і реалізації супресивних функцій регуляторних Т-клітин (які визначаються як CD4+, Foxp3+, CD25+, CD127), а відсутність ІЛ-2 або порушення його зв'язку з рецептором проявляється функціональним дефіцитом регуляторних Т-клітин, що є причиною аутоімунних реакцій організму [20, 45, 52]. Багато експериментальних досліджень показали, що цей цитокін має вирішальне значення для підтримки функціонування Treg-клітин: за відсутності ІЛ-2 Т-супресори зникають з периферичних лімфоїдних органів, мабуть, тому, що дефіцит цього фактору росту призводить до загибелі клітин [18, 25, 52].

Так само важлива, як 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 фактору Stat5 [49, 52]. Обмежена доступність ІЛ-2 в тканинах, що зазнали локального запалення, може призвести до нестабільності клітин Treg,

втрати експресії Foxp3 і подальшого виробництва патогенних цитокінів ефекторними клітинами, які можуть посилити аутоімунізацію [18, 45].

Оскільки зрілі клітини Treg не виробляють ІЛ-2, а він, ймовірно, функціонує аутокринно, невідоме було джерело цитокіну, 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 внутрішньовидової візуалізації і показали, що регуляторні і стандартні Т-клітини локалізуються разом з антигенами, які представлені дендритними клітинами, і в цих клітинних кластерах стандартні клітини реагують на антиген шляхом секреції ІЛ-2, тоді як клітини Treg цей цитокін приймають [18, 52].

Таким чином, було встановлено, що ІЛ-2 служить як для стимуляції імунної відповіді, так і для її контролю і стримування. Цікавим є питання про те, за яких обставин яка 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 цитокіну та індукцією регуляторних клітин у відповідь на тривалий вміст низького рівня цитокінів [8, 13, 52]. 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-2 стандартних CD4+ Т-клітин не дозволяє їм підтримувати їх тривалу експресію [8, 18]. 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 [25, 35, 47].

Нарешті, слід згадати, що ІЛ-2 здійснює важливі функції по відношенню до інших клітин лімфоїдного ряду, включаючи НК-клітини і лімфоїдні клітини вродженої імунної відповіді. В одних випадках ІЛ-2

може збільшувати кількість CD56+ NK-клітин, які вважаються популяцією переважно мікрооточення пухлин, в інших – сприяє проліферації лімфоїдних клітин вродженої імунної відповіді, що сприяє продукції ІЛ-5, що, в свою чергу, призводить до еозинофілії та альтернативної активації макрофагів [8, 31, 40]. Крім того, ІЛ-2 контролює й CD25+ клітини, необхідні для підтримки тканинного гомеостазу [18].

Дослідження в області генетики вказують на вирішальну роль порушень регуляції ІЛ-2, як фактору ризику аутоімунних захворювань. Рідкісні мутації, що порушують аутокринний механізм регуляції ІЛ-2, можуть викликати важкі форми імунної дизрегуляції. Дефіцит рецепторів ІЛ-2 призводить до хронічного імунодефіциту і розвитку ІРЕХ-синдрому (імуннодизрегуляція, поліендокринопатія, ентеропатія і Х-пов'язаний синдром) – варіабельним аутоімунним реакціям, що розвиваються в перший рік життя і зумовленими мутацією транскрипційного активатора FOXP3 [1]. Мутації в транскрипційних факторах STAT5B, що опосередковують сигнали ІЛ-2, також пов'язані з первинним імунодефіцитом і змінною аутоімунізацією, що часто призводить до рецидивуючих інфекцій, екзем, хронічної діареї та лімфоїдної інтерстиціальної пневмонії. Варіанти мутацій, також пов'язаних з різними аутоімунними захворюваннями, були виявлені в генетичних локусах, що кодують ІЛ-2, його рецептори, і пов'язані сигнальні фактори [45, 50, 52].

Нещодавно розроблене витончене картування генів (fine mapping) може бути використаним для визначення цих пов'язаних із захворюванням варіантів, для оцінки механічного впливу на регуляцію ІЛ-2RA і створення лікарського засобу майбутнього, що працює безпосередньо щодо порушених клітинних реакцій [6]. Крім того, CRISPR дає можливість «коригувати» серйозні мутації, які порушують сигналізацію ІЛ-2 або переписувати послідовності кодуючих генів, контролюючих специфічну регуляцію сигнальних компонентів ІЛ-2 для генної інженерії в терапії майбутнього [5, 37].

1.2 Вплив інтерлейкіну-2 на нервову систему

Недавні дослідження [20, 21, 40, 46] показують, що лімфоцити можуть секретувати класичні нейропептиди, тоді як периферична імунізація може сигналізувати про гіпоталамічні нейрональні клітини. Ці результати призвели до більш глибокого аналізу функції цитокінів як модуляторів периферичної та центральної нервової систем. У минулому вважалося, що роль мозкових цитокінів полягає лише в надмірності їх активності в периферичній імунній системі. Проте, в даний час відомо, що цитокіни центральної нервової системи мають вибірковий вплив на нейрональні клітини [39-41]. Крім того, недавні дослідження виявили участь різних цитокінів в патофізіологічних процесах неврологічних і нервово-психічних захворювань [38, 47]. Проте, незважаючи на велику кількість опублікованої літератури, більша частина цих клінічних знань залишається корелятивною, і велика частина фундаментальних досліджень зі зрозумілих причин спирається на експериментальні розробки *in vitro*. Однак моделі нокауту тварин дозволили отримати цінне уявлення про складну біологію цитокінів, головним чином ІЛ-2. Дійсно, дослідження намагалися розкрити вплив ІЛ-2 на септогіпокампульну систему та пов'язані з нею шляхи, які регулюють навчання, пам'ять та інші процеси [47].

У дослідженнях [29, 30, 39, 47] показано, що лімфоцити можуть секретувати класичні нейропептиди, тоді як периферична імунізація може сигналізувати про гіпоталамічні нейрональні клітини. Ці результати призвели до більш глибокого аналізу функції цитокінів, як модуляторів периферичної нервової системи та центральної нервової системи [21].

Раніше вважалося, що роль мозкових цитокінів зводиться лише до їх надмірної активності в периферичній імунній системі. Проте, в даний час встановлено, що цитокіни центральної нервової системи мають

селективний вплив на нейрональні клітини, як це було продемонстровано Zalzman et al. [53]. Згідно з його дослідженням, ІЛ-1, ІЛ-2 й ІЛ-6 впливають на активність моноамінових ферментів в гіпоталамусі, гіпокампі і префронтальній корі головного мозку [20, 53].

Ці результати лягли в основу зростаючого масиву досліджень, спрямованих на розкриття можливих периферичних і центральних механізмів дії різних цитокінів. Також цікавим є чи можуть відомі функції цитокінів впливати на фізіологію мозку, центральні поведінкові процеси і патофізіологію неврологічних і нервово-психічних розладів. До цих пір більша частина цих досліджень була зосереджена на впливі цитокінів на септогіпокампальну систему і пов'язані з нею шляхи, які служать навчанню, пам'яті та іншими пов'язаними з ними процесами [20, 53]. Наприклад, довготривала потенціація гіпокампу, що є важливим нейробіологічним механізмом навчання і накопичення пам'яті, регулюється активністю багатьох відомих цитокінів [32].

У нормальних умовах імунний нагляд за центральною нервовою системою безперервно здійснюється невеликою кількістю циркулюючих периферичних Т-лімфоцитів [25]. Цитокіни, отримані з периферичних імунних клітин, не так легко перетинають гематоенцефалічний бар'єр. Механізми транспорту цитокінів в головний мозок розрізняються для кожного цитокіну (наприклад, активний і пасивний транспорт), що впливає на ступінь їх проникнення до центральної нервової системи [39].

Goehler et al. [26, 30] раніше було описано, як область постреми діє як анатомічний інтерфейс між периферичною імунною системою і головним мозком. Раніше була описана роль периферичної імунної системи в патології головного мозку; наприклад, аферентні сенсорні волокна блукаючого нерва можуть переносити сигнали, ініційовані інтерлейкіном-1 (ІЛ-1), в області стовбура головного мозку, включаючи ядро tractus solitarius. Таким чином, вагусна сенсорна активація може відбуватися під час інфекції; це забезпечить вхід в мозок і змінить

поведінку, яка, наприклад, проявляється через симптоматику менінгіту [30, 45].

Точно так само недавні дослідження показали, що підвищений транспорт Т-клітин в головний мозок є ключовою ланкою розсіяного склерозу і експериментального аутоімунного енцефаліту, при якому аутореактивні Т-клітини індукують патологію головного мозку [35].

Ступінь, в якій цитокіни, відмінні від ІЛ-1, сигналізують центральну нервову систему через блукаючий нерв, і вплив торгівлі Т-клітинами на патофізіологію нервово-психічних розладів, ще потрібно визначити. На рівні центральної нервової системи кілька цитокінів і цитокінових рецепторів безпосередньо синтезуються ендогенними клітинами головного мозку. Ці цитокіни виявляють нейромодуляторні та нейротрофічні ефекти, які обмежуються дуже специфічними нервовими шляхами. Попередні дослідження гібридизації *in situ* виявили експресію рецепторів до ІЛ-1 [26], антагоніста ІЛ-1Р [34] і ІЛ-6Р [48] в зубчастій звивині дослідних тварин. Експресія генів рецепторів ІЛ-2 також була виявлена у всьому гіпокампу і зубчастій звивині [45].

Розташування цих цитокінів та їх рецепторів на рівні гіпокампу ставить їх у становище, яке впливає на навчання та пам'ять серед інших форм поведінки та модулює нейробіологічні процеси, відомі як опосередковані цими формами поведінки [39, 47].

1.3 Роль інтерлейкіну-2 в процесах навчання і пам'яті

Як згадувалося раніше, Meola et al. [44] описана експресія білку GFP в численних взаємопов'язаних структурах мозку і ядрах мишей ІЛ-22p8GFP. Експресія білку GFP була виявлена в енторинальній та соматосенсорній корі головного мозку, які відіграють важливу роль у просторовій пам'яті, навігації та пропріоцепції. Аналогічно, миші ІЛ-22p8-GFP також експресують білок GFP в латеральній перегородці,

мигдалеподібному тілі, смугастому тілі, поясному і дорсальному ендопіріформном ядрі-областях мозку, які регулюють сенсомоторну будову [29, 39]. Білок GFP був також виявлений в декількох гіпоталамічних ядрах, які проєктуються в гіпофіз або контролюють терморегуляцію. Дослідження підтвердили, що миші з дефіцитом ІЛ-2 з периферичним аутоімунітетом демонстрували дефіцит навчання в водному лабіринті Морріса в порівнянні з контролем, але миші з дефіцитом ІЛ-2 без периферичного аутоімунітету демонстрували аналогічні результати в якості контролю. Це дозволяє припустити, що дефіцит ІЛ-2 у поєднанні з периферичним аутоімунітетом відповідальний за спостережувані дефекти навчання на тваринних моделях [38, 40, 52]. Встановлено, що ІЛ-2 є основним потужним модулятором вивільнення ацетилхоліну з гіпокампу [45]. Дійсно, в зрізах гіпокампу щурів ІЛ-2 модулює ацетилхолін дозозалежним двофазним чином, стимулюючи його вивільнення при дуже низьких концентраціях і інгібуючи його при більш високих концентраціях, тоді як холінергічні інтернейрони навпаки, не реагують на ІЛ-2 [45, 53]. Оскільки гіпокамп контролює просторове навчання та консолідацію пам'яті, ІЛ-2, схоже, змінює ці процеси через взаємодію з септогіпокампульними холінергічними нервовими закінченнями в гіпокампі [43-45, 52], де він може змінювати довгострокову потенціацію і впливати на різні параметри когнітивної діяльності у тварин [44]. Було виявлено, що літні миші особливо вразливі до повторного введення ІЛ-2, що виявляється подальшим дефіцитом пам'яті і селективним пошкодженням нейронів гіпокампу [18, 38]. Аналогічним чином, хронічне дозування ІЛ-2 також порушує робочий компонент просторової пам'яті у неагресивних щурів у водному лабіринті Морріса [22, 24, 27, 28]. Однак, ми не знаємо жодного клінічного дослідження, що порівнює ефект екзогенного введення ІЛ-2 у літніх і молодих людей. Одне цікаве відкриття, зроблене Меолою та ін. [44], це значно підвищені рівні передімпульсивного інгібування у трансгенних мишей, позбавлених

експресії гена ІЛ-2 як в центральній, так і в периферичній імунній системі. Це порівняно з мишами, які продукують ІЛ-2 виключно в головному мозку і мають дуже низькі реакції на переляк. Проте загальний вплив ІЛ-2 на передімпульсивне інгібування залишається маловивченим, оскільки втрата загального гена бета-рецептора для ІЛ-2 призводить до парадоксального зниження передімпульсивного інгібування [37, 38]. ІЛ-2 також може впливати на фактори, що модифікують передімпульсивне інгібування, такі як вивільнення дофаміну [38]. Тому необхідні подальші дослідження, які більш детально вивчать цю складну асоціацію.

Таким чином, роль внутрішнього і зовнішнього ІЛ-2 в септогіпокампальній системі залишається складною і ще не повністю вивченою. Дефіцит ІЛ-2, як встановлено в моделях нокауту, відповідальний за порушення формування пам'яті й навчання. Точно так надлишок рівня ІЛ-2, що досягається при хронічному дозуванні, може порушити просторову пам'ять. На клітинному рівні ІЛ-2 може проявляти нейротрофічну модуляцію нейронів гіпокампу. Зокрема, нокаут ІЛ-2 може змінювати розвиток гіпокампу та викликати ендогенні зміни центральної нервової системи, що згодом призводить до збільшення обсягу Т-клітин, які надходять в мозок [25, 44]. Ці дані дозволяють припустити, що внутрішня зміна ІЛ-2, його рецепторів та пов'язаних з ними модуляторів може бути залучено не тільки в процесі центрального аутоімунітету, але і в генерацію нейродегенеративних патологій, таких як шизофренія та хвороба Альцгеймера. Оскільки дослідження зв'язку між септогіпокампальною системою та нервово-психічними розладами стають все більш цікавими, роль тваринних моделей, зокрема мишей-нокаутованих за ІЛ-2, виявиться суттєвою для розкриття природи такого зв'язку [47, 49, 52]. Використання експериментальних моделей тварин допоможе заповнити прогалини в сучасних знаннях. Це дозволить додатково окреслити складність біологічної дії ІЛ-2 в центральній нервовій і імунній системі і дасть уявлення про те, як варіації в імунологічному

гомеостазі й активності Т-клітин у мишей-нокаутованих ІЛ-2 можуть викликати патофізіологічні процеси, що беруть участь в аутоімунних процесах і нейродегенерації [47, 53].

Хоча багато досліджень задокументували периферичні зміни імунітету у пацієнтів із психіатричними та неврологічними порушення, майже всі ці дані у людини є співвідносними. Дії ІЛ-2 щодо нейророзвитку, функції та захворювання є результатом впливу ІЛ-2 в периферичній імунній системі та властиві дії в центральній нервовій системі. Визначення як і за яких умов (наприклад, розвиток гострої травми) ці різні дії ІЛ-2 діють на мозок, є важливими для досягнення успіху в розумінні багатогранного впливу ІЛ-2 на функцію та захворювання центральної нервової системи. Моделі мишей надали способи отримання нових уявлень про те, як складна біологія цитокіну, такого як ІЛ-2, може мати одночасний, динамічний характер впливу на численні системи [18, 52]. Наприклад, регулювання гомеостазу в мозку та імунній системі, аутоімунітет, що може впливати на обидві системи. Використання подібних моделей тварин у галузі психоневроімунології може призвести до критичного прогресу в нашому розумінні ролі мозкових цитокінів і аутоімунітету при нейродегенеративних захворюваннях (наприклад, хвороба Альцгеймера), розлад нейророзвитку (наприклад, аутизм, шизофренія) та аутоімунні захворювання, включаючи розсіяний склероз [44].

Існує велика кількість досліджень, які свідчать про те, що ІЛ-2 бере участь у розвитку центральної нервової системи, нормальній фізіології мозку та гомеостатичних механізмах відновлення, а також дисфункції мозку та нейродегенеративних процесах [47].

Залежно від методології та умов, дані підказують що мікроглія, астроцити та нейрони можуть виробляти цитокіни [43-45]. У системах культури ІЛ-2 забезпечує трофічну підтримку нейронів із гіпокампу та медіальної перегородки та посилює невритове розгалуження. Примітно

показано, що ІЛ-2 є одним з найпотужніших модуляторів вивільнення ацетилхоліну зі шматочків гіпокампа щурів [44, 52]. В шматочки гіпокампа, ІЛ-2 модулює ацетилхолін у залежності від дози, потенціюючи вивільнення при дуже низьких концентраціях та інгібування вивільнення у більш високих концентраціях, тоді як холінергічні інтернейрони в стріатумі не відповідають на ІЛ-2. Доклінічні дослідження на тваринах обґрунтували ефекти ІЛ-2 на схемі септогіпокампу. Оскільки гіпокамп має важливе значення для просторового навчання та консолідації пам'яті, напевно, ІЛ-2 може змінити обробку пам'яті за допомогою взаємодії з септогіпокампульними холінергічними нервовими терміналами в гіпокампі та різні параметри когнітивної діяльності у тварин [52, 53]. У мишей було виявлено особливо вразливий до багаторазового дозування ІЛ-2, який проявлявся у дефіциті пам'яті та пошкодженні нейронів, які були селективними для гіпокампу. Наскільки нам відомо, таких досліджень систематично перевірених немає, чи люди похилого віку – наприклад, ті, хто приймає імунотерапію ІЛ-2 для лікування раку є більш вразливими до впливу ІЛ-2, ніж молодші дорослі. Однак хронічне дозування ІЛ-2, показане лабораторією Енісмана, щоб зірвати цей робочий компонент просторової пам'яті у некерованих щурів використовували водний лабіринт [44, 49]. ІЛ-2 був залучений до патогенезу декількох основних психіатричних та неврологічних розладів, включаючи такі, що проявляються нейропатологічними змінами септогіпокампульної системи. У посмертному гіпокампі було виявлено, що у хворих на хворобу Альцгеймера рівень ІЛ-2 підвищений порівняно з контролем [47].

Нові результати досліджень показали, що дефіцит ІЛ-2 у мозку індукує ендогенні зміни центральної нервової системи. Насправді нокаутовані миші по ІЛ-2 проявляли підвищену концентрацію білка в гіпокампі ендогенних аттрактантів хемокіну Т-клітин головного мозку [47], що збігаються з посиленням трафіком аутоімунних Т-клітин у мозок, як дзеркала, відносно величини, прогресування аутоімунітету в периферії

[47, 52]. В недавньому дослідженні трансгенні миші з центрального нокауту експресії гена ІЛ-2 демонстрували в середньому в подвоєнні кількості Т-клітин, які передаються в їхній мозок. Це порівняно з мишами з нормальною експресією ІЛ-2 центральною нервовою та периферичною імунною системами [47, 52]. Подвоєння Т-клітини спостерігали у трьох випробуваних областях мозку: гіпокампі, септальній та мозочковій області. Цікаво, що на відміну від мишей, які зростали в неволі у моделях дикого типу рівень посиленого самонаведення Т-клітин до мозочка ІЛ-2, миші відбувалися незалежно від експресії гена ІЛ-2 мозку [44, 47]. Ці результати можуть натякати на теорію, що нокаутом ІЛ-2 центральна нервова система запускає ендогенні зміни мозку, які згодом збільшують своє Т-клітинне самонаведення. Вони також підтримують нові дослідження, що вказують на порушення регуляції центрального ендогенного імунологічного середовища через втрату гена ІЛ-2 експресії, в кінцевому рахунку ініціюючи процеси аутоімунності центральної нервової системи при деяких неврологічних та психіатричних захворюваннях [52].

З іншого боку, порівняно з мишами дикого типу, ІЛ-2 нокаутом моделі мають знижений рівень холіну ацетилтрансферази позитивно нейронам в області медіальної перегородки мозку [20, 44]. Холінергічний фенотип стріатуму однаковий між двома групами. Крім того, схоже, що у мишей з ІЛ-2 нокаутом менше клітин інфрапірамідних гранул гіпокампу [44, 52]. Дослідження дійсно показали, що у мишей з дефіцитом ІЛ-2 спостерігається посилений нейрогенез в шарах клітин інфрапірамідного та надпірамідального гранул [44, 49, 53]. Дані свідчать про те, що ІЛ-2 може забезпечити трофічну підтримку нейронів гіпокампу шляхом зміни нейротрофічних та нейромодулюючих дій. Таким чином, відсутність або погіршення стану мозку ІЛ-2 може відігравати ключову роль, наприклад, у постійному збільшенні в клітинах із зубчастими гранулами протягом першого року життя та впливають на цілісність аксонів у зубчастій звивині [20].

Petitto J.M. встановлено, що нейротрофна активність ІЛ-2 є можливо опосередкованою через нейротрофний фактор, що походить від мозку та фактор росту нервів. У його дослідженнях ІЛ-2 нокаутовані миші мали значно знижену концентрацію нейротрофного фактору мозку та підвищену концентрацію фактору росту нервів в гіпокампі [45]. Нейротрофний фактор мозку відіграє роль у підтримці та відновленні септальної холінергіки нейронів. Використовуючи механізм позитивного зворотного зв'язку, він посилює вивільнення ацетилхоліну та модулює постнатальний нейрогенез, таким чином потенційно впливаючи на гранулярне клітинне число. Механізм взаємодії між ІЛ-2 та нейротрофним фактором мозку ще не з'ясований. Хоча нейротрофний фактор мозку експресується в периферії імунної системи лімфоцитами, ІЛ-2 не стимулює його вироблення або вивільнення в цих клітинах. ІЛ-2 може знижувати експресію TrkB, рецептора для нейротрофного фактору мозку, у лімфоцитах [25, 47]. Крім того, деякі дані свідчать про те, що нейротрофний фактор мозку може стимулювати механізм позитивного зворотного зв'язку самостійно через рецептор TrkB у нейронах гіпокампу [47]. Тому ІЛ-2 може потенційно знижувати регуляцію рецептора TrkB, тим самим частково інгібуючи позитивні впливи виробництва нейротрофного фактору мозку.

Як продовження попередніх досліджень, було проведено нещодавнє дослідження для з'ясування причини скорочення холінергічних клітин в медіальній перегородці ІЛ-2 нокаутованих мишей. Виявлено, що трансгенна модель має більш високий рівень фактору росту нервів в медіальній перегородці з однаковим рівнем коефіцієнту нейротрофного фактору мозку до контролів [32]. Втрата клітин, зменшення забарвлених нейронів в медіальній перегородці може бути поясненою зміною холінергічного фенотипу. Це, мабуть, викликано втратою мозком похідного ІЛ-2 через периферичну імунорегуляцію. Підвищення рівня фактору росту нервів в медіальній перегородці відображає те, що було

раніше описано на рівні гіпокампу. Відповідно до зниження виживаності медіальної септальної холінергіки, що спостерігається в ІЛ-2 нокаутуваних мишей, можливо, гіпокамп-цільові нейрони у цих тварин можуть виробляти більш високий рівень білка фактору росту нервів, як компенсаційна відповідь. Дійсно, помірні ураження проєкції септогіпокампа щурів призводять до посилення експресії мРНК для фактору росту нервів, але не нейротрофного фактору мозку в клітинах-мішенях гіпокампа [32, 36, 47].

Похідний від центральної нервової системи ІЛ-2 допомагає підтримувати холінергічну септогіпокампу схему. Цікаво, що дисбаланс нейротрофних факторів спостерігається у ІЛ-2 нокаутуваних мишей, також виявляється в посмертному гіпокампі пацієнтів з Альцгеймером [20]. ІЛ-2 викликає зміни можуть бути частиною патофізіології різних нейродегенеративних захворювань, таких як хвороба Альцгеймера. Нарешті, деякі дослідження встановлювали вплив ІЛ-2 на активність рецепторів N-метил-D-аспартату та визначили, що ІЛ-2 модулює синаптичну пластичність, пригнічуючи індукцію та підтримку тривалого збільшення синаптичної передачі. Альтернативно, рецептори N-метил-D-аспартату, які є фонотропними рецепторами глутамату, відіграють істотну роль у формуванні пам'яті [20, 21, 27]. Це свідчить про те, що цитокіни можуть функціонувати як модулятори збудливості. Ця складна асоціація може лежати в основі таких пізнавальних процесів, як пам'ять і навчання та, може бути залучена до патофізіології неврологічних таких захворювань, як хвороба Альцгеймера [20].

Вплив нокауту ІЛ-2 на периферичну імунну систему та аутоімунітет вивчений лише нещодавно. Дослідження встановили, що нокаут ІЛ-2 у мишей з розвитком аутоімунних захворювань, що вражають декілька органів системи, включаючи серцево-судинну та шлунково-кишкову системи, характеризується інфільтрацією Т-клітин та осадженням аутоантитіл [25, 35]. Миші з нокаутом ІЛ-2 мають дефіцит автоактивної дії

Т-регуляторних клітин. Останнім часом Zhi et al. Встановлено, що у тих мишей, імунна система яких була відновлена з Т-клітинами з моделей нокаутування ІЛ-2 розроблено периферичний аутоімунітет, що демонструється збільшенням ваги їх селезінки порівняно з контролями []. У трансгенній моделі суттєве збільшення проліферації Т-лімфоцитів в селезінці призводить до характерної лімфопроліферативної спленомегалії, що вказує на Т-автоімунітет [47].

1.4 Фізична активність та інтерлейкін-2

Відомо, що цитокіни являються класом поліпептидних ендогенних медіаторів міжклітинних взаємодій, які приймають участь у багатьох важливих фізіологічних процесах. Дослідження ролі в адаптації до різних фізичних навантажень почалося з відкриття деяких цитокінів, як гуморальних факторів, які були звільнені зі скоротливих м'язових клітин і мали серйозні метаболічні ефекти, почалося дослідження їх ролі в адаптації до різних фізичних навантажень [10, 15, 17, 36].

Цитокіни є біологічно активними факторами, продуктами дуже багатьох клітин різних тканин і органів, вони виробляються клітинами в процесі їх життєдіяльності у відповідь на певні зовнішні впливи [28, 33, 41-43]. Тільки у окремих цитокінів синтез носить конститутивний характер, будучи відповіддю на різного роду впливи, що продукуються клітинами. Цитокіни виступають в ролі регуляторів всіх основних етапів життєдіяльності, очевидно, будь-якої клітини організму, модулюючи процеси проліферації, диференціювання, спеціалізованого функціонування, міграції та апоптозу [8, 33, 36, 50].

Позиція В.К. Pedersen (2007) [41] про скорочувальний м'яз, як орган, який продукує цитокіни, відкрила абсолютно нову парадигму, що скелетні м'язи – це ендокринний орган, який шляхом секреції гормоноподібних факторів може впливати на обмін речовин в тканинах і органах. Далі було

запропоновано, що цитокіни та інші пептиди, які вивільняються і виробляються волокнами м'язів, мають паракринні, аутокринні або ендокринні ефекти, та їх потрібно класифікувати як «міокіни» [9, 28, 31, 33]. Отже, міокіни дають можливість пояснити як м'язи спілкуються з іншими органами. Надалі дослідники шукали зв'язок між м'язами і змінами в периферичних органах у вигляді «фактору вправ», який може вивільнятися зі скелетних м'язів під час скорочення та супроводжувати деякі з вправ, викликаючи метаболічні зміни в інших органах, таких як жирова тканина і печінка [41-43]. В 2000 році вже стало ясно, що скорочення скелетних м'язів людини виводить значні кількості інтерлейкіну-6 в кровообізі при тривалому навантаженні [50]. Дослідження в наступні роки підкреслили той факт, що отриманий з м'язів інтерлейкін-6 є важливим гравцем в метаболізмі [40, 48]. На сьогоднішній день вже відомо, що скелетні м'язи здатні продукувати декілька міокінів. В список цих речовин входять інтерлейкін-8, інтерлейкін-6, інтерлейкін-15, фактор інгібітор лейкемії і нейротрофний фактор мозку [31, 42, 50]. Механічне розтягування м'язової тканини, найбільш ймовірно, необхідно для нормальної м'язової функції і адаптації, і всі клітини насправді гинуть без розтягування або контактного подразника [28, 31, 43]. На сьогодні ретельніше вивчається місцеві механізми адаптації в м'язовій тканині і можливість незапальної адаптації скелетних м'язових тканин до фізичних навантажень. Фактори росту, цитокіни, гормони, кисневі радикали є відповідальними за м'язову адаптацію [32, 36, 43]. В скелетних м'язах людини активується чутливий до кисню гіпоксія-індукований фактор після фізичного навантаження і може впливати на експресію генів фактора росту ендотелію судин. Локальна система, що включає фактор, що інгібує лейкемію і його рецептор, ймовірно, також існує в м'язовій тканині і може частково контролювати регенерацію м'язів після ушкодження [50]. Також були описані інші можливі локальні системи адаптації. Таким чином, для адаптації скелетних м'язів до фізичних навантажень є необхідною участь

як локальних, так і системних факторів. Відкриття цитокінів (ендогенних поліпептидних медіаторів) і їх імунорегуляторної ролі супроводжувалося дослідженнями, що демонструють, що вони були залучені в складну мережу зв'язку між імунною і нейроендокринною системами. Наступні дослідження показали, що за взаємодією між імунною системою та фізичними вправами є можливість оцінення ролі цитокінових і ендокринних механізмів при фізичному навантаженні [17, 19]. Саме імунна система розпізнає стресові сигнали різної природи і передає через кровообіг інформацію в центральну нервову систему за допомогою цитокінів. А центральна нервова система, обробивши цей сигнал, регулює імунну систему за допомогою нейропептидів та гормонів гіпоталамо-гіпофізарно-адреналової вісі [8]. На сьогоднішній день накопичено багато інформації щодо впливу фізичних навантажень під час занять спортом та фізкультурою на імунітет, яка потребує подальшого вивчення та узагальнення. Дослідження гуморальних факторів місцевого і загального імунітету є досить інформативним методом. Отже, вивчення імунологічної реактивності організму людини, що перебуває в стресових умовах, може допомогти вчасно виявляти невідповідність запропонованих навантажень функціональним можливостям імунної системи і сигналізувати про розвиток зриву адаптивно-приспосувальних механізмів основних органів і систем імунітету людини, що може призвести до патологічних станів усього організму в цілому [8, 43]. Стрес – це неспецифічна реакція організму на будь-яку пред'явлену йому вимогу (дію зовнішніх і внутрішніх подразників). При стресі особливу роль в регуляції психонейроімунної взаємодії займають цитокіни, які мають великий спектр клітинних мішеней, регулюючи інформаційні взаємодії між клітинами центральної, імунної та ендокринної нервової системи [8, 50]. Основними факторами виробництва міокінов є різні види вправ. Рівень експресії міокінов збільшується пропорційно кількості м'язової маси, задіяної при цьому та тривалості виконання вправи. Вони, зв'язуючись з

клітинами паракринним та аутокринним способом, забезпечують адаптацію до фізичних навантажень та підтримання гомеостазу [50].

Так за даними наукової літератури відомо, що при навантаженнях великої інтенсивності зрушення в цитокиновому каскаді в крові аналогічні таким при помірних навантаженнях, але відрізняються виразністю проявів і схожі на спостережувані при сепсисі або травмах: в плазмі зростає концентрація інтерлейкіна-6, інтерлейкіна-1 α , фактора некрозу пухлин- α , інтерферона- α , а надалі збільшується вміст інтерлейкіна-10, інтерлейкіна-1 β та ін. [40-41]. При цьому встановлено, що при стресовій реакції норадреналін дозозалежно стимулює синтез інтерлейкіна-6 в астроцити, який в свою чергу активізує каскадний синтез прозапальних цитокінів: інтерлейкіна-1, інтерлейкіна-2 і фактора некрозу пухлини- α [15, 40-43]. Активація Т-клітинного цитокинового каскада викликає підвищення продукції органоспецифічних аутоантитіл, що призводить до розвитку аутоімунних станів і реакцій, пов'язаних з пошкодженням систем і органів [15]. Цікавим є те, що, з позиції впливу цитокінів у спортивній медицині є спроби трактування фізіологічних механізмів адаптації до надмірного стресу, зокрема при фізичному навантаженні. Так, Smith L. L. (2000) [50] висунув гіпотезу, згідно якої значна кількість прозапальних цитокінів (фактор некрозу пухлин- α , інтерлейкін-1 β , інтерлейкін-6, інтерлейкін-8), зумовлюючи системне запалення, координує реакцію всього організму: регулює функцію печінки (підтримує глікогеногенез, синтез білків гострої фази, а також катаболічні процеси), забезпечує вплив на функціональний стан ЦНС, і впливає на імунітет. Саме за цим автором [50] дається визначення синдрому перенапруження, як стану, при якому спортсмен тренується занадто, але продуктивність стає гіршою. Як правило, наслідком цього є зміна поведінки, настрою, та різноманітними коливаннями в фізіологічних та біохімічних показниках [15, 50]. Третім етапом загального адаптаційного синдрому за Г. Сельє розглядається синдром перенапруження, з акцентом на виживання і відновлення, а не

адаптацію, і може вважатись «захисним». Тобто, це процес, що відбувається у відповідь на надмірний фізіологічний та фізичний стрес. Стресреалізуюча реакція імуно-нейро-ендокринної системи є складовою відповіді гострої фази, яка індукована генною експресією, синтезом «стрес-білків» та імунних медіаторів, в першу чергу – фактора некрозу пухлин- α та інтерлейкіна-1b, які відіграють роль тригерних механізмів стрес-відповіді. Тригерні цитокіни діють безпосередньо на нейросекреторні клітини гіпоталамусу, стимулюючи синтез та вивільнення кортикотропін-релізінг-гормону, а потім – адренкортикотропного гормону і тим самим спричиняють активацію гіпоталамогіпофізарно-наднирникової осі [8-10]. Під час аналізування сучасних матеріалів фахових літературних джерел, щодо участі цитокінів в адаптації до фізичної тренуваності, було визначено, що під час скорочення скелетних м'язів людини вивільняється значна кількість міокінов (інтерлейкін-6, інтерлейкін-8, інтерлейкін-15, нейротрофічний фактор мозку, факторінгібітор лейкемії) в кровообізі при тривалому навантаженні. Також встановлено, що зрушення в цитокіновому каскаді в крові при навантаженнях великої інтенсивності, на відміну від помірних, відрізняються виразністю проявів і схожі на спостережувані при травмах або сепсисі. Дослідження гуморальних факторів імунітету, зокрема вмісту цитокінів, є досить інформативним методом для вивчення імунологічної реактивності організму людини, що знаходиться в стресових умовах. Отже, на сьогоднішній день накопичено багато інформації як про позитивний так і негативний вплив фізичних навантажень під час занять фізкультурою і спортом на імунітет, яка потребує подальшого дослідження та узагальнення. Таким чином, ми можемо продовжити вивчення ролі цитокінів при адаптації до фізичного навантаження.

ІЛ - 2 являє собою мономерний глікопротеїн з мол. масою 14,6 кД, що включає 133 амінокислотних залишків. ІЛ-2 людини кодується одним

геном, що включає 6684 пари нуклеотидів, і складається з 4 екзонів і 3 інтронів. [6].

Основними продуцентами ІЛ - 2 є Т-хелпери. Субпопуляція даного клітинного типу неоднорідна за таким показником як синтез різних цитокінів. Проте, приблизно 75% її клітин синтезують саме ІЛ-2. Близько 20% цитотоксичних Т-клітин також здатні до продукції даного цитокіну. На синтез ІЛ - 2 в цих клітинах впливають не тільки антигени або мітогени, але і ряд інших біологічно активних сполук. Так, певні цитокіни (ІЛ-1, ІЛ-6, ПБ, ІФН), що продукуються іншими класами клітин, стимулюють продукцію ІЛ-2 у преактивованих антигеном Т-клітин. Гормони тимуса (тимозин, сироватковий фактор тимуса) забезпечують диференціювання незрілих тимоцитів в клітини-продуценти ІЛ-2. Іонофори, що збільшують рівень внутрішньоклітинного Ca^{2+} , також підсилюють продукцію даного цитокіну. [18].

Інтерлейкін - 2 (ІЛ-2) має ряд властивостей, що роблять його важливим протипухлинним агентом. В даний час розроблено і впроваджено в клінічну практику кілька препаратів рекомбінантного ІЛ-2, створених з використанням *E. coli* (Пролейкін, Тецелейкін, Біолейкін) і дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* (Ронколейкін® , Альбулейкін). Існують різні методи застосування рекомбінантного ІЛ-2, серед яких найбільш ефективними є імунохіміотерапія і комбінація зі специфічною імунотерапією. Найбільший досвід застосування рекомбінантного ІЛ - 2 накопичений при лікуванні дисемінованих форм нирковоклітинного раку і меланоми. Розробляються схеми лікування лімфопроліферативних захворювань, сечового міхура, раку шийки матки, колоректального раку. Найбільш перспективними напрямками розвитку лікувальних режимів з використанням рекомбінантного ІЛ - 2 є пошук нових хіміопрепаратів, що мають потенціуючу дію відносно ІЛ-2, а також введення ІЛ-2 з урахуванням біологічних ритмів. [6;18;47].

РОЗДІЛ 2

ОРГАНІЗАЦІЯ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Організація дослідження

Для експерименту застосовували безпородних былих статевозрілих мишей-самців. Під час роботи дотримувалися загальних етичних принципів по використанню та догляду 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).

Період дослідження тривав 6 тижнів. Для експерименту сформували 5 дослідних груп (n=90). Першій дослідній групі тварин 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. Тваринам V групи підшкірно вводили фізіологічний розчин. Введення препаратів відбувалося 3 рази на тиждень, перед кожним тренуванням. Через 4 тижні зробили

перерву на 14 днів. Після перерви на 6 тижні відбувся контроль післядії препарату.

Щоб оцінити адаптивний вплив на загальну фізичну працездатність тварин, кожен день через 1 годину після введення препарату та зважування, використовували метод примусового плавання до повного виснаження з вантажем, відповідно 7,5% від маси тіла. Рівень навантаження - середній аеробно-анаеробний [7]. Тварин розміщували в циліндр (h = 30 см, d=30 см), який наповнювали теплою водою ($t=25\pm 1^\circ\text{C}$), в якому тварини плавали до повного виснаження. В області міжребер'я стягуючою стрічкою закріплювали вантаж. Критерієм повного виснаження тварин були 3 безуспішні спроби виплисти на поверхню або ж відмова тварин та опускання їх на дно. Вимірювання фізичної працездатності відбувалося за часом тривалості плавання тварин від моменту потрапляння їх у воду та до повного виснаження або ж занурення на дно [46].

Перед початком експериментального дослідження було проведено попереднє тестування плавання (1 тиждень) – для визначення орієнтовного часу працездатності з певним вантажем. Надалі дослідження показників фізичної працездатності дослідних тварин поділили на періоди для визначення певних адаптаційних змін (контроль, два, чотири та шість тижнів). За контроль брали показники плавання в 1 день тренувань дослідних тварин.

Тест «Відкрите поле» проводили 1 раз на тиждень, тривалість тесту 5 хвилин. Проводили зйомку тесту та надалі обробляли відео за допомогою програми TimeReader.

Статистичну обробку проводили за допомогою програми Statistica 10.0. Використовували непараметричні критерії Вілкоксона та Манна-Уїтні. Різницю вважали достовірною при $p \leq 0,05$.

У роботі дотримувалися як стандартні вимоги до проведення досліджень, так і вимоги Європейської конвенції щодо захисту тварин від жорстокого поводження. Такими умовами були: постійна

експериментальна обстановка (окреме приміщення зі стандартним освітленням, ізольоване від сторонніх подразників); не більше 1-2 дослідників; повноцінний харчовий раціон тварин, багатий вітамінами; однаковий час годування і дослідження з урахуванням біоритмів поведінкових реакцій; утримання тварин у клітках в кількості не більше 10 особин однієї статі; чітке маркування кожної дослідної тварини [1, 4, 7, 51].

2.2 Методика «Відкрите поле»

Методика «Відкритого поля», яка широко застосовується в сучасному нейрофізіологічному експерименті, була високо оцінена завдяки своїй простоті та надійності. Впроваджена в практику лабораторних досліджень Hall C. S. у 1934 році, методика дозволяє кількісно оцінити моторну активність щурів або мишей за 2-ма компонентами: в вертикальній стійці та горизонтальній – локомоція. Також, методика дозволяє реєструвати окремі форми поведінки (заходження у центр, нерухомість, кількість полюсів та інше) при всій важкості інтерпретації показників, що реєструються під час методики, може дати точні показники – характеристику стану тварин (збудження, страх або збільшення орієнтовної реакції) [1, 12, 14].

О.Г. Кенунен та В.Л. Козловський відмічають взаємозалежність між локомоцією та стійкою. Звичайне збільшення одного показника супроводжується збільшенням іншого. В нормі рухова поведінка мишей або щурів має певну «структуру», що проявляється присутністю кореляції між кількістю стійок та локомоціями. Виявлений зв'язок між вертикальними та горизонтальними компонентами не залежить від рівня рухової активності. При багаторазовому тестуванні співвідношення залишається [14].

Можна зробити висновок, що про певну структуру цього виду природньої активності тварин свідчить аналіз зв'язку між вертикальним та горизонтальним компонентами рухової поведінки щурів. О.Г. Кенуненом та В.Л. Козловським був з'ясований аналогічний зв'язок між компонентами локомоторної активності [2, 14]. Обчислювання коефіцієнта кореляції між стійками та локомоціями вносить в широко відому методику «Відкритого поля» нову інформацію про цілісність структури рухової поведінки лабораторних тварин.

По суті методика складається з вимірювання поведінки тварин, яких помістили в відкритий простір незнайомий для них, втекти з якого неможливо, так як він оточений прозорими стінами. Прояв цієї поведінки залежить від дії на тварину різних тест-факторів, таких як:

- А) стимуляція (збудження), як результат здивування – переляку від перебування в звичних умовах середовища;
- Б) збудження щурів при переміщенні їх у «Відкрите поле»;
- В) пошук в оточуючому середовищі експеримента, що складається з «Відкритого поля» та його оточення;
- Г) увесь попередній досвід при тест-ситуаціях [1, 4, 12, 16].

Тож останній фактор свідчить, що серед інших параметрів, в тесті вимірюється “звикання” та ”навчання” в реакції на тест «Відкритого поля». Будь-який поведінковий експеримент показує відображення реакцій тварин на зовнішні фактори. Кожний фактор відображає певний диференційований ефект у тварини з врахуванням різного генетичного та досвідного фону кожної тварини. Значущість кожного окремо виявленого поведінкового типу буде похідним від взаємодії цих факторів.

Фактори які можуть варіювати - підрозділ на висоту стін, щільність підлоги, апаратура, її розміри, форма, колір, запах, присутність або відсутність, характер розташування “місця старту”, та природа додаткових стимулів. Також, саме умови оточуючого середовища – характер,

інтенсивність та розташування джерел світла, запахів та звуків, а також позиція дослідника та обзрівання – носить варіюючий характер [1-4].

Параметри поведінки реєструють візуально, а також ведеться відеозапис поведінки щурів для аналізу з використанням програми RealTime. Поміщення тварини в нове оточення веде до виникнення дослідницького поведінки, якому в той же час перешкоджають умови, що викликають страх. Дві антагоністичні тенденції характеризуються різним часовим ходом.

Для периферичного сектора візуально реєструють:

- кількість стійок;
- кількість і тривалість актів грумінгу;
- кількість дефекацій.

Для аналізу динаміки дослідницької активності дослідної тварини протягом тестування швидкість руху тварини і кількість стійок усереднюють для послідовних інтервалів тривалістю 1 хв.

Завмирання миші в «відкритому полі» розглядають як симптом страху. Найкращим відображенням зменшення страху у тварин є дослідження ними внутрішнього сектора. Зміна емоційного стану супроводжуються зміною роботи внутрішніх органів. Вегетативна функція, яку зручно враховувати разом з вимірюванням активності – це дефекація. Виявлено негативну кореляцію між дефекацією та дослідженням центральної частини відкритого поля. Стійки розглядаються як індекс дослідницької активності, чутливий до рівня тривожності або дії анксиолітиків (транквілізаторів). Грумінг трактується як «змішану» поведінку.

Ті тварини, які менше пересуваються і у яких спостерігається велика дефекація в ситуації «відкритого поля», вважаються більш емоційними, ніж ті, які багато пересуваються, але мають низький рівень дефекації [1, 3, 4, 14].

Дослідження орієнтовно-дослідного поведінки виконували за методикою Буреш Я. І., Ломтева Н. А. [1]. Час експозиції кожної особини в «відкритому полі» становило 5 хвилини. Тварини тестувалися одноразово. Миша поміщалася в центр «відкритого поля». Фіксували латентний період першого руху, час пересікання периферичних квадратів, час пересікання центральних квадратів, вертикальних стійок з опорою на бортик та без опори на бортик, актів вмивання або ж грумінг, кількість посліду або болюсів, що вважається показником емоційної реактивності [1, 3] і тривожності [14]. Після тестування тварина поверталася в клітку, а поверхня поля ретельно відмивалася перед поміщенням наступної дослідної миші.

Як видно на рисунку 2.1 «відкрите поле» – це кругла арена, $d = 1$ м, сторона квадрата – 10 см. «Відкрите поле» поділено на центральну та периферичну зони, поділені на квадрати.



Рис. 2.1. Методика дослідження поведінки в тесті «Відкрите поле»

2.3 Тест примусового плавання (Порсольта)

Тест вимушеного плавання (або тест на поведінку відчаю) – це тест, який зосереджується на реакції тварини на загрозу загибелі, результат якого трактується як вимірювання сприйнятливості до негативного настрою. Тест масово застосовується для оцінки ефективності антидепресантів, хоча істотні критичні зауваження в його інтерпретації [23, 24, 46].

Тварини проходять два випробування, під час яких вони змушені плавати в скляному циліндрі, який був заповнений водою, з якого неможливо вибратися. Час першої проби - 15 хвилин. Повторне випробування проводиться через добу, яке триває 5 хвилин. Вимірюється час, який випробувальна тварина проводить у другому випробуванні, не роблячи ніяких рухів крім тих, які необхідні для утримання голови над водою. Цей час нерухомості можна скоротити різними типами антидепресантів, а також електричним шоком [46].

Інший поширений варіант цього тесту на поведінку, спеціально використовуваний для мишей, проводиться лише за одне випробування і триває шість хвилин. Сучасні варіанти тестування поведінки плавання та скелелазіння окремо, оскільки показано, що поведінка у плаванні посилюється селективними інгібіторами зворотного захоплення серотоніну, а поведінка піднімання підвищується селективними інгібіторами зворотного захоплення норадреналіну, такими як дезипрамін та мапротилін [27].

Безнадія тварини представляється класичною нерухомістю у другому тесті яка трактується, як поведінковий корелятор негативного настрою. Тварини, яким дають антидепресанти, плавають довше та важче (що є основою для тверджень про достовірність тесту). Однак, між вченими існує певна дискусія щодо того, чи замість цього підвищена нерухомість демонструє звикання чи навчання, і тому це буде позитивною поведінковою адаптацією: тварина менш боїться, тому що зараз вона знайома з середовищем тесту. Таке тлумачення підтверджується тим, що

навіть щури, які вперше були поміщені у контейнер, з якого вони можуть втекти (і тому не відчувають відчаю), демонструють знижену рухливість під час другого випробування [22].

Термін «поведінковий тест на відчай» має антропоморфну конотацію і є дещо суб'єктивним описом, оскільки невірно, чи тест надійно вимірює настрій тварини чи відчай. Суворо кажучи, описовий термін «випробування на вимушене плавання» надає перевагу дослідникам. Випробування з використанням примусового плавання критикується групами з захисту прав тварин, зокрема РЕТА [7, 37].

При тестуванні кожен мишу поміщали в скляний циліндр, наповнений водою температурою 25 градусів Цельсія до рівня 20 см. оцінювали час і число активного плавання, дрейфу і стану повної невагомості у воді протягом 5 хвилин. Тварину вважали нерухомою, коли вона зависала у воді без руху. При дрейфі миша робила тільки слабкі вимушені рухи задніми однією або двома лапами. Для підтримки голови над поверхнею води [7, 11, 24, 46]. На рисунку 2.2 зображено, як відбувається плавання мишей.



Рис. 2.2. Тест примусового плавання (тест Порсольтя)

РОЗДІЛ 3

АНАЛІЗ РЕЗУЛЬТАТІВ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Показники рухової активності та дослідницької поведінки дослідних груп мишей за методикою «відкрите поле»

В тесті «відкрите поле» результати оцінювали за показниками: 1) рухової активності та орієнтовно-дослідницької реакції (час рухової активності на периферії поля, час знаходження в центрі поля, кількість вертикальних стійок); 2) емоційної реактивності та вираженості пасивного страху (час завмирання, час грумінгу, кількість дефекацій) [1, 3, 16].

Нами було проведено дослідження різних аспектів функціонування центральної нервової системи мишей при введенні різних доз рекомбінантного інтерлейкіну-2 та його інгібітору – циклоспорину. Визначення досліджуваних параметрів проводили на 1-4-му та 6-му тижнях експериментального дослідження.

В таблиці 3.1 показано, що показники рухової активності на периферії та в центрі й кількість стійок у всіх дослідних груп відрізнялися в залежності від періоду експерименту.

Таблиця 3.1

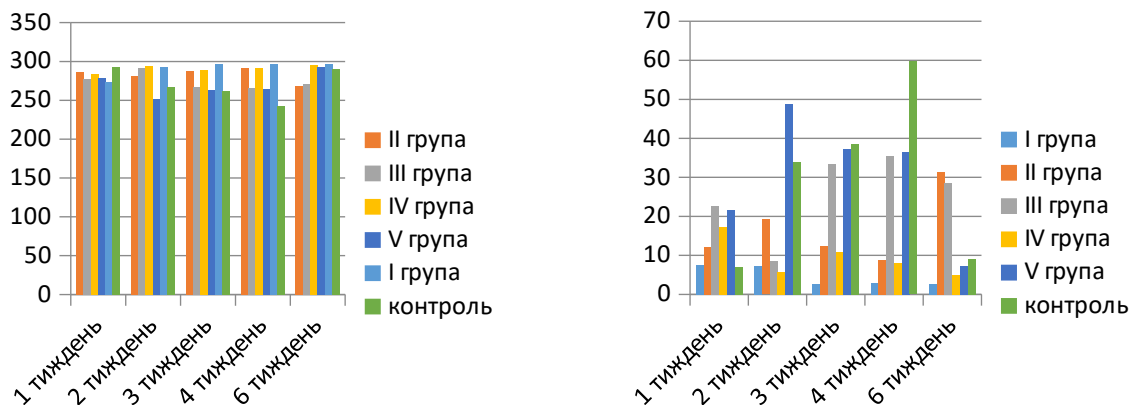
Рухова активність та показники дослідницької активності дослідних груп мишей за методикою «відкрите поле», $M \pm m$

Досліджувані показники	Група тварин	1 тиждень	2 тиждень	3 тиждень	4 тиждень	6 тиждень
Рухова активність (периферія), с	I група	273,22±12,3	293,33±12,8	297,2±13,4	296,82±13,4	296,94±13,3
	II група	286,96±12,91	280,81±12,64	287,65±12,9	291,44±13,1	268,6±12,2
	III група	277,97±12,51	291,47±13,1	266,54±12,9	265,29±11,1	271,5±12,2
	IV група	283,42±12,75	294,18±13,2	289,36±13,1	291,9±13,1	295±13,3
	V група	278,79±12,54	251,89±11,34	263,05±11,1	264,65±11,1	292,3±13,1
	контроль	292,57±12,82	266,89±12,1	262,15±11,1	242,67±10,1	290,84±13,1

Рухова активність (центр), с	I група	7,46±0,33	7,3±0,33	2,7±0,12	2,89±0,13	2,61±0,11
	II група	12,21±0,55	19,2±0,86	12,33±0,55	8,7±0,4	31,42±1,4
	III група	22,76±1,02	8,59±0,39	33,39±1,5	35,55±1,6	28,56±1,3
	IV група	17,3±0,78	5,63±0,25	10,93±0,49	8,12±0,3	4,98±0,22
	V група	21,6±0,97	48,76±2,19	37,3±1,7	36,62±1,6	7,28±0,32
	контроль	7,07±0,31	33,97±1,53	38,58±1,6	59,69±2,7	8,99±0,4
«Стійки», кількість	I група	2,75±0,12	6±0,27	2,33±0,1	1±0,04	0,5±0,02
	II група	5,25±0,24	3,5±0,16	7,67±0,34	4,33±0,19	9±0,4
	III група	5,75±0,26	2±0,08	5,67±0,25	8,33±0,37	3±0,13
	IV група	8,5±0,38	2,5±0,11	3,33±0,15	2,67±0,12	1,5±0,06
	V група	18±0,81	23,25±1	15,33±0,69	24±1,08	1±0,04
	контроль	1±0,04	9±0,4	20±0,9	18±0,81	2±0,08

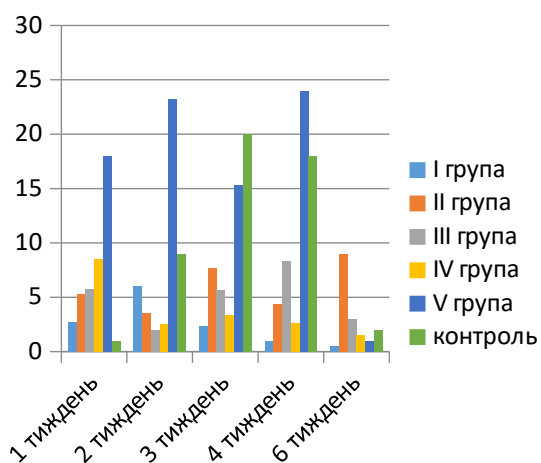
Динаміка змін рухової активності та дослідницької поведінки мишей

показано на рисунку 3.1.



Рухова активність (периферія), с

Рухова активність (центр), с



«Стійки», кількість

Рис. 3.1. Динаміка рухової активності та показників дослідницької активності мишей за методикою «Відкрите поле»

При аналізі динаміки змін рухової активності та дослідницької поведінки мишей, було з'ясовано, що рухова активність в центрі поля та кількість стійок у мишей I експериментальної групи з інгібуванням ІЛ-2, були достовірно меншими в середині та наприкінці експерименту. Але показник рухової активності на периферії був найменшим лише на 1 тижні дослідження.

В тварин II групи, що отримували ІЛ-2 в малій концентрації (5000 МО/кг), не було значних коливань показника часу рухової активності на периферії протягом всього експерименту. Рухова активність в центрі поля та кількість горизонтальних стійок значно підвищились на 6 тижні. Це можна пояснити звиканням тварин до невеликих доз препарату, що вводився.

Аналізуючи показники III та IV групи тварин із введенням ІЛ-2 в середній та високій концентрації (7500 МО/кг та 30000 МО/кг відповідно), можна відмітити, що рухова активність на периферії протягом всього експерименту вище в IV дослідній групі. Але показник рухової активності в центрі протягом дослідження був значно вищим в тварин III групи. В свою чергу кількість стійок лише на 1 тижні дослідження була вищою в групі тварин із введенням ІЛ-2 у високій концентрації. Це може свідчити про емоційну нестабільність тварин. Подібні показники можуть вказувати на негативний вплив великих доз препарату ІЛ-2.

Так, показники рухової активності тварин контрольної групи (без фізичного навантаження) суттєво не відрізнялися від аналогічних показників V дослідної групи, що отримували ін'єкції фізіологічного розчину. Показники рухової активності в центрі поля та кількість вертикальних стійок в тварин V групи були дещо вищими, ніж в інших досліджуваних групах, лише на 6 тижні спостерігали зниження.

3.2 Емоційна реактивність, тривожність та стрес-реактивність дослідних груп мишей за методикою «відкрите поле»

До числа актуальних проблем фізіології вищої нервової діяльності відноситься питання про зв'язок між типологічними особливостями поведінки тварин і стійкістю їх організму до дії стресових факторів. Індивідуально-типологічні особливості поведінки відображають певну специфіку окислювальних процесів мозку і тому дозволяють з відомою ймовірністю прогнозувати більшу чи меншу стійкість до циркуляторної гіпоксії мозку як однієї з причин патології центральної нервової системи [1, 12, 21].

Однак до кінця неясно, які ж з поведінкових показників найбільш значущі. Найважливішим поведінковим проявом на зовнішній подразник є емоція. Встановлено, що негативні емоції пасивно-оборонного характеру призводять до розвитку й посилення перебігу патологічних синдромів різного походження [1, 4]. Разом з тим відзначено залежність між ступенем стійкості до несприятливих впливів і вихідної руховою активністю тварин. У літературі є також дані про те, що на виживаємість тварин при важких патологічних станах впливають їх початкова емоційність та ступінь вираженості рухової та пошукової активностей [1, 3].

В тестах з лабораторними гризунами емоційна реактивність зазвичай оцінюється за рівнем дефекації і уринації. Цей показник є проявом страху тварини, про нього можна судити також і по іншим проявам – виразності (кількості проявів) реакції завмирання і числу епізодів грумінгу. Останній показник є проявом «конфлікту» між тривожністю і дослідницької мотивацією. Основою процесу адаптації тварини до нових та потенційно загрозливих умов середовища є здатність організму протистояти стрес-факторам. В цілому стан тривоги, прояви депресії і стрес-реактивність, як правило, проявляються спільно [3, 12, 14].

Слід зазначити, що і «знак» відмінностей і її ступінь достовірності відрізнялися на різних етапах експерименту. Найбільш чіткий, з етологічної точки зору, показник розвитку реакції страху – це реакція завмирання. Можна вважати, що у мишей всіх груп при знаходженні їх в новій ситуації «відкритого поля» має розвиватися реакція страху [9-12].

Тож можна відзначити, що у тесті «відкрите поле» були виявлені відмінності між дослідними групами в показниках емоційної реактивності та вираженості пасивного страху.

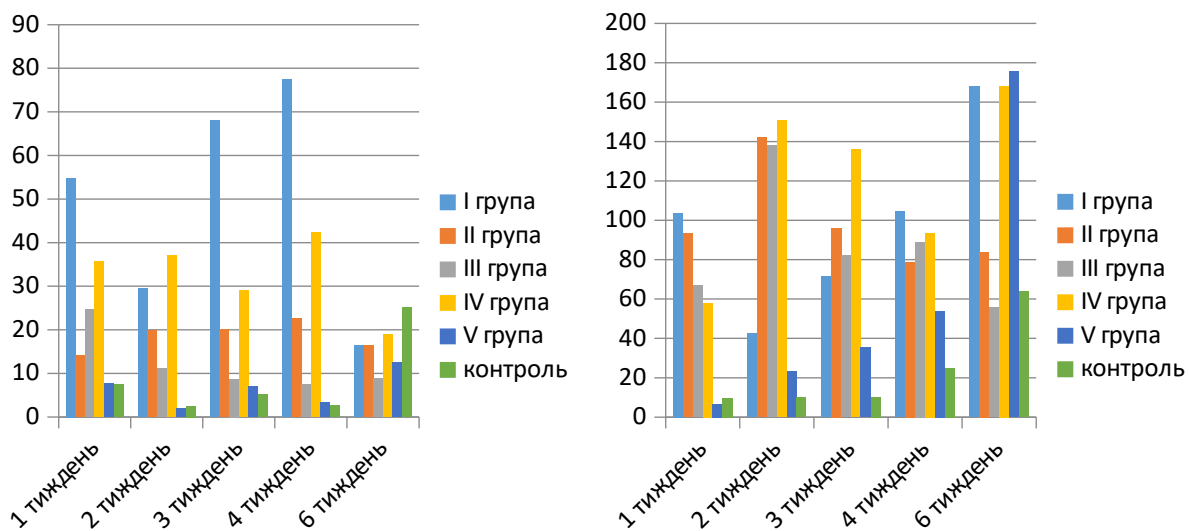
Так у тесті «відкрите поле» були виявлені відмінності між групами в показниках емоційної реактивності, тривожності та стрес-реактивності (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Емоційна реактивність, грумінг та завмирання в тесті «відкрите поле» дослідних груп мишей в умовах стимуляції та інгібування ІЛ-2, $M \pm m$

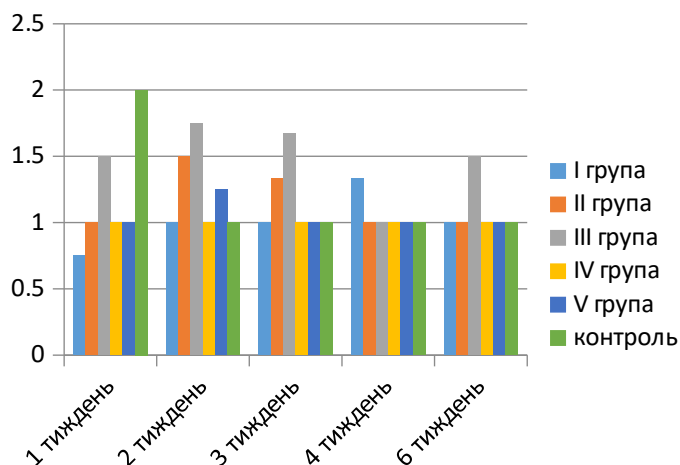
Досліджувані показники	Група тварин	1 тиждень	2 тиждень	3 тиждень	4 тиждень	6 тиждень
ОГрумінг, с	I група	54,82±2,2	29,39±0,94	67,92±2,72	77,36±3,1	16,44±0,74
	II група	14,16±0,57	19,85±0,79	20,02±0,8	22,68±0,91	16,42±0,73
	III група	24,66±0,98	11,21±0,45	8,71±0,39	7,38±0,29	8,85±0,39
	IV група	35,73±1,43	37,02±1,48	29,09±1,18	42,38±1,69	18,86±0,85
	V група	7,65±0,3	1,9±0,07	6,95±0,31	3,35±0,14	12,52±0,56
	контроль	7,44±0,3	2,53±0,1	5,15±0,22	2,7±0,11	25,03±1,12
Завмирання, с	I група	103,79±4,1	42,44±1,69	71,62±2,86	104,62±4,18	167,83±7,55
	II група	93,19±3,7	141,99±5,68	96,06±3,84	78,84±3,55	83,93±3,78
	III група	66,99±2,68	137,9±5,5	82,05±3,28	89,02±4,02	55,75±2,51
	IV група	58,01±2,32	150,82±6,03	135,9±5,44	93,61±4,21	168,33±7,57
	V група	6,7±0,27	23,03±0,9	35,39±1,42	53,98±2,43	175,63±7,9
	контроль	9,79±0,39	9,86±0,4	10,26±0,41	25±1,12	63,97±2,88
Дефекація, кількість	I група		1±0,04	1±0,04	1,33±0,05	1±0,04
	II група	1±0,04	1,5±0,06	1,33±0,05	1±0,04	1±0,04
	III група	1,5±0,06	1,75±0,07	1,67±0,07	1±0,04	1,5±0,06
	IV група	1±0,04	1±0,04	1±0,04	1±0,04	1±0,04
	V група	1±0,04	1,25±0,06	1±0,04	1±0,04	1±0,04
	контроль	2±0,08	1±0,04	1±0,04	1±0,04	1±0,04

Динаміку змін досліджуваних поведінкових проявів (грумінг, завмирання, дефекація) видно на рисунку 3.2.



Грумінг, кількість

Завмирання, кількість



Дефекація і уринація, кількість

Рис. 3.2. Динаміка проявів тривожності та стресу у досліджуваних мишей за методикою «Відкрите поле»

Показник часу грумінгу протягом 1-4 тижня дослідження був значно вищим у I групі тварин. В IV дослідній групі показник часу грумінгу був нижчим, ніж у тварин I групи, але вище, ніж в інших групах. На 6 тижні експериментального дослідження спостерігається стабілізація показників актів грумінгу в усіх дослідних групах, без значних відмінностей.

Протягом всього періоду дослідження спостерігається коливання показника розвитку реакції страху – завмирання тварин. Динаміка змін досліджуваних поведінкових проявів показує, що час завмирання I групи

тварин був найвищим на 6 тижні експерименту, та майже відповідав аналогічному показнику IV та V дослідних груп. Час завмирання тварин II та III груп був стабільним практично протягом всього дослідження, спостерігалось значне підвищення часу завмирань лише на 2 тижні експерименту. В IV групі тварин спостерігалось підвищення часу завмирань протягом всього дослідження, крім 1 тижня. В контрольній та V групі тварин показник завмирання був нижчим, ніж в інших дослідних групах, та значно не підвищувався протягом експерименту. Але можна вважати, що у тварин всіх дослідних груп під час знаходження їх в новій ситуації «відкритого поля» розвиваються реакції емоційної реактивності та страху.

Також можна відмітити, що протягом експериментального дослідження не спостерігалось значних змін в кількості актів дефекації тварин всіх дослідних груп, окрім III, в якій відмічалось більше актів дефекації на 1-3 та 6 тижні.

3.3. Показники фізичної працездатності під час примусового плавання з вантажем (тест Порсольта) дослідних груп мишей

Фізична працездатність – це здатність організму тривалий час з певною ефективністю виконувати певну фізичну роботу (навантаження) із найменшими фізіологічними витратами та найвищими результатами. Вона тісно пов'язана з фізичною підготовленістю (тренуваністю) та станом здоров'я [8, 15]. Фізична працездатність є інтегральним вираженням функціональних можливостей організму й характеризується багатьма об'єктивними факторами, такими як антропометричні показники, функціональні можливості м'язів, стан опорно-рухового апарату, серцево-судинної системи й ендокринної системи та ін. [10, 36].

Існує загальноприйнята думка, що регулярні фізичні навантаження сприяють нормальному функціонуванню організму, зміцнюють здоров'я.

Особливо ефективні заняття спортом для профілактики й лікування захворювань коронарних артерій, гіпертонічної хвороби, атеросклерозу, ожиріння, хронічних обструктивних захворювань легенів, діабету, захворювань скелетно-м'язової системи, нирок, стресових ушкоджень, тривожних і депресивних станів та інших патологічних станів [8, 36]. Однак дуже інтенсивні та тривалі фізичні навантаження можуть шкідливо діяти на функціонування організму. Більш того, є досить тривожні дані про ослаблення функцій імунітету і, як наслідок цього, більшою чутливістю до захворювань, зокрема, інфекцій верхніх дихальних шляхів, у спортсменів після тривалих тренувань, при синдромі перетренованості і навіть на піку спортивної форми [8, 36]. Ці спостереження не завжди пов'язані з гіперактивацією симпато-адреналової системи та гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової осі, що могло б служити підставою для віднесення викликаних порушень імунітету виключно на рахунок імунодепресивної дії стресу. Вплив фізичних навантажень різної інтенсивності і тривалості на стан імунної системи багато в чому залишається ще не досить ясним. Причини ослаблення імунної системи, способи її корекції та профілактики також в повній мірі не відомі, хоча безсумнівно повинні представляти величезний практичний інтерес для медицини, біології та фізичної реабілітації [8, 10, 17, 36].

Проаналізувавши показники фізичної працездатності під час примусового плавання з вантажем (табл.3.3 , рис. 3.3), було встановлено, що максимальний час плавання I та III експериментальних груп тварин спостерігався на 6-му тижні. В той час як максимальний показник фізичної працездатності дослідних тварин II та IV групи спостерігався на 4-му тижні, а на 6-му тижні несуттєво зменшився.

Таблиця 3.3

Показники фізичної працездатності мишей в умовах впливу інтерлейкіну-2, с (M±m)

Групи	Період фізичного навантаження
-------	-------------------------------

дослідних тварин	контроль	1 тиждень	тиждень	3 тиждень	4 тиждень	6 тиждень
I група	128,75±5,79	150,17±6,75	245,08±11,02	248,11±11,16	358,44±16,12	473,00±21,28
II група	160,50±7,22	177,17±7,97	166,00±7,47	239,00±10,75	304,56±13,70	278,00±12,51
III група	192,25±8,65	195,00±8,77	309,83±13,94	374,55±16,85	388,22±17,46	503,00±22,65
IV група	148,00±6,66	183,25±8,24	186,50±8,39	259,33±11,66	278,55±12,54	274,00±12,33
V група	203,00±9,135	206,17±9,27	332,42±14,95	396,89±17,86	395,11±17,77	392,50±17,66

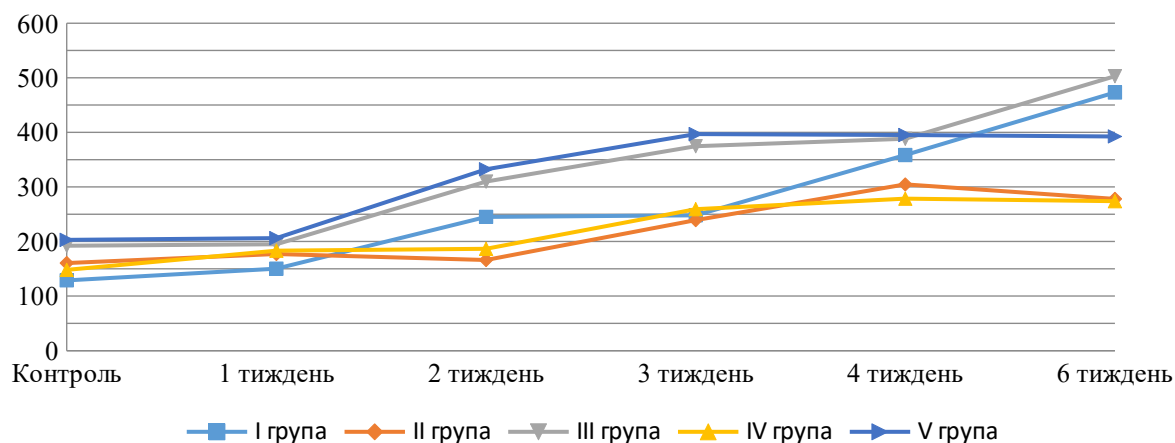


Рис. 3.3. Показники фізичної працездатності мишей в умовах стимуляції та інгібування інтерлейкіну-2, с

Протягом всього експерименту час плавання тварин I групи зростав: значне збільшення показників фізичної витривалості відмічалось на 2 тижні на $63\pm 3\%$, на 4 тижні – на $44,4\pm 2\%$ та на 6 тижні – на $32\pm 1,5\%$. В дослідній групі під номером II спостерігався приріст фізичної тренуваності на 1, 3 та 4 тижні (на $10,4\pm 0,5\%$, на $44\pm 2\%$, на $27,4\pm 1,2\%$ відповідно), а на 2 та 6 тижні незначне зниження (на $6,3\%$ та $8,7\%$ відповідно). Показник фізичної витривалості значно збільшився лише на 3-му тижні. Час плавання тварин III дослідної групи протягом усього експерименту збільшувався, найбільший приріст на 2-му ($58,9\pm 3\%$), 3-му ($20,9\pm 1\%$) та 6-му ($29,6\pm 1,4\%$) тижнях. Показник фізичної витривалості тварин IV групи збільшувався протягом всього експерименту (найбільший приріст на 3 тижні – на $39,1\pm 2\%$), окрім 6 тижня (незначне зниження на $1,6\%$). Досліджуваний показник V групи тварин досяг максимуму на 3-му тижні

(найбільший приріст на 2-му тижні – на $61,2 \pm 3$ %), надалі час плавання несуттєво знизився (менше 1 %).

Після 4-го тижня експериментального дослідження було зроблено перерву на 14 днів для визначення післядії стимуляції та інгібування ІЛ-2. На 6-му тижні експерименту було визначено, що показники фізичної витривалості тварин I та III групи ($473 \pm 22,17$ с, $503 \pm 24,89$ с відповідно) перевищували аналогічні показники інших груп. При цьому максимальний показник фізичної витривалості показали тварини III групи. Час примусового плавання тварин V групи в цей період ($392,5 \pm 19,26$ с) перевищував аналогічні показники тварин II та IV груп, але не сягав таких показників тварин I та III груп. Лише тварини після введення ІЛ-2 в середній концентрації та його інгібітору показали підвищення часу примусового плавання в період післядії порівняно з 4 тижнем. Це може бути результатом можливої дії препаратів, а не лише фізичних навантажень.

Також протягом експерименту було встановлено, що в усіх дослідних тварин час примусового плавання на 6-му тижні значно перевищував аналогічні показники першого дня тренування. Максимальний приріст показників фізичної тренованості на 6-му тижні порівняно з початковими значеннями був відмічений у I дослідної групи. Час примусового плавання виріс на $344,25 \pm 16,21$ с, що відповідає збільшенню на $267,4 \pm 13$ %. Досліджуваний показник тварин III та IV дослідних груп також показали достовірний приріст (на $161,65 \pm 8$ % – III та на $85,1 \pm 4$ % – IV група). У дослідних групах II та V розрив прикінцевих показників примусового плавання тварин (у порівнянні з контролем) не мав достовірних відмінностей (найменший приріст в II групі – $77,2 \pm 3$ %).

ВИСНОВКИ

1. Розглянуто основні відомості щодо ролі ІЛ-2 в організмі людини. ІЛ-2 – це фактор, який продукується зрілими Т-хелперами в результаті їх стимуляції антигеном, відомий як найважливіший фактор росту Т-клітин та необхідний для їх проліферації і диференціювання. ІЛ-2 посідає важливе

місце в системі інтерлейкінової регуляції імунітету, посилює процеси як клітинного, так і гуморального імунітету. Найбільш раннім терапевтичним застосуванням ІЛ-2 була стимуляція імунної відповіді в онкохворих.

2. Досліджено рухову активність і дослідницьку поведінку досліджуваних мишей під впливом ІЛ-2. З'ясовано, що рухова активність в центрі поля та кількість стійок у мишей I дослідної групи з інгібуванням ІЛ-2, були достовірно меншими в середині та наприкінці експерименту. У тварин II групи, що отримували ІЛ-2 в малій концентрації (5000 МО/кг), не було значних коливань показника часу рухової активності на периферії протягом всього експерименту. Рухова активність в центрі поля та кількість горизонтальних стійок значно підвищились на 6-му тижні. Це можна пояснити звиканням тварин до невеликих доз препарату. Аналізуючи показники III та IV групи тварин із введенням ІЛ-2 в середній та високій концентрації (7500 МО/кг та 30000 МО/кг відповідно), можна відмітити, що рухова активність на периферії протягом всього експерименту вище в IV дослідній групі. Але показник рухової активності в центрі протягом дослідження був значно вищим в тварин III групи. В свою чергу кількість стійок лише на 1 тижні дослідження була вищою в групі тварин із введенням ІЛ-2 у високій концентрації. Це може свідчити про емоційну нестабільність тварин. Подібні показники можуть вказувати на негативний вплив великих доз препарату ІЛ-2.

3. Досліджено емоційну реактивність, тривожність та стрес-реактивність досліджуваних мишей під впливом ІЛ-2. Протягом всього періоду дослідження спостерігається коливання показника розвитку реакції страху – завмирання тварин. Динаміка змін досліджуваних поведінкових проявів показує, що час завмирання I групи тварин був найвищим на 6 тижні експерименту, та майже відповідав аналогічному показнику IV та V дослідних груп. Час завмирання тварин II та III груп був стабільним практично протягом всього дослідження, спостерігалось значне підвищення часу завмирань лише на 2 тижні. В IV групі тварин

спостерігалось підвищення часу завмирань протягом всього дослідження. Можна вважати, що у тварин всіх дослідних груп під час знаходження їх в новій ситуації «відкритого поля» розвиваються реакції емоційної реактивності та страху. Також можна відмітити, що протягом експериментального дослідження не спостерігалось значних змін в кількості актів дефекації тварин всіх дослідних груп.

4. Досліджено показники фізичної працездатності мишей під час примусового плавання з вантажем в умовах тривалого впливу рекомбінантного ІЛ-2. Встановлено, що максимум часу плавання I та III дослідних груп спостерігався на 6-му тижні. В той час як фізична працездатність тварин II та IV групи сягала максимуму на 4-му тижні, а на 6-му тижні несуттєво зменшилася. Встановлено, що в усіх дослідних тварин час примусового плавання на 6-му тижні значно перевищував аналогічні показники першого дня тренування. Максимальний приріст показників фізичної працездатності на 6-му тижні порівняно з початковими значеннями був відмічений у I групи тварин. Час примусового плавання виріс на 344,25 с, що відповідає збільшенню на 267,4 %. Тварини III та IV дослідних груп також показали достовірний приріст часу плавання: на 162 % – III група та на 85 % – IV група тварин. II та V група не мала достовірних відмінностей між прикінцевими показниками примусового плавання тварин (у порівнянні з контролем).

Тож, проаналізувавши показники поведінкової активності та фізичної працездатності дослідних груп тварин під впливом ІЛ-2, відзначено дозозалежний вплив препарату на адаптаційні зрушення в поведінці.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Буреш Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: Высшая школа, 1991. 390 с.

2. Відкрите поле, як один із методів вивчення поведінкових реакцій тварин. Електронний ресурс: <http://www.grandbiology.com/biols-339-1.html>. (дата звернення 25.10.20)
3. Гостюхина А.А., Замощина Т.А., Светлик М.В., Жукова О.Б., Зайцев К.В. и др. Поведенческая активность крыс в «открытом поле» после световой или темновой деприваций и физического переутомления. Бюллетень сибирской медицины. 2016;15(3):16–23. DOI: 10.20538/1682-0363-2016-3-16–23
4. 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.
5. Интерлейкин-2: механизмы регуляции и перспективы терапии. Електронний ресурс: <https://medach.pro/post/1413> (дата звернення 25.10.20)
6. Інтерлейкіни: будова і функції. Електронний ресурс: http://serpensmed.blogspot.com/p/blog-page_829.html (дата звернення 23.10.20)
7. Каркищенко Н.Н. Биомедицинское (доклиническое) изучение лекарственных средств, влияние на физическую работоспособность. Методические рекомендации. М: ФМБА России; 2017. 134 с.
8. Козлов В. А. Иммунная система и физические нагрузки / В. А. Козлов, О. Т. Кудаева // Медицинская иммунология. – 2002. – Т. 4. – № 3. – С. 427–438.
9. Коритко З. І. Сучасні уявлення про загальні механізми адаптації організму до дії екстремальних впливів / З. І. Коритко // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – Вип. 4 (1). – С. 28–35.
10. Меерсон Ф. З. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам / Ф. З. Меерсон, М. Г. Пшенникова. – М. : Медицина, 1988. – 256 с.

11. Оковитый С. В., Радько С. В. Влияние различных фармакологических веществ на восстановление физической работоспособности после нагрузок в эксперименте Том 81, № 4 (2018) экспериментальная и клиническая фармакология, с. 28-34.
12. Перепелкина О.В. Поведение мышей, селектированных на большой и малый вес мозга : Автореф. дис. ... канд. биолог. Наук: 03.00.13 / Перепелкина Ольга Викторовна ; МГУ. – М., 2009. – 22 с.
13. Сарапульцев П.А., Сарапульцев А.П. Стресс и иммунная система. Цитокины и воспаление. 2014; 13(4): 5-10.
14. Тестирование безопасности наноматериалов по поведенческим реакциям животных. Методика теста «открытое поле». . Электронный ресурс: <https://refdb.ru/look/2078746-p11.html>
15. Футорний С. М. Особливості імунологічної адаптації під впливом значних фізичних навантажень / С. М. Футорний, Є. В. Імас, О. І. Осадча, Е. А. Шматова, П. В. Глуховський // Науковий часопис НПУ імені М. П. Драгоманова. – 2018. – Вип. 10 (104). – С. 93–98.
16. Швець В. А. Вплив інтерлейкіну-2 на поведінкову активність у тесті "відкрите поле" при фізичному навантаженні / В. А. Швець, Н. А. Дьяченко // VI Міжнародна заочна науково-практична конференція «Актуальні питання біологічної науки»: Збірник статей. – Ніжин: НДУ імені Миколи Гоголя, 2020. – С. 117-120.
17. Швець В. А. Участь цитокінів в адаптації до фізичного навантаження / В. А. Швець // Альманах науки. – 2019. – № 6/1 (27). – С. 4-6.
18. Abbas AK, Trotta ER, Simeonov D, Marson A, Bluestone JA. Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. Science Immunology. 2018; 3(25). DOI: 10.1126/sciimmunol.aat1482
19. Akerstrom T, Steensberg A, Keller P, Keller C, Penkowa M, Pedersen BK. Exercise induces interleukin-8 expression in human skeletal

muscle. *The Journal of Physiology*. 2005; 563(2): 507-16. DOI:
10.1113/jphysiol.2004.077610

20. Alves S., Churlaud G., Audrain M., Michaelsen-Preusse K., Fol R., et al. Interleukin-2 improves amyloid pathology, synaptic failure and memory in Alzheimer's disease mice. *Brain*. 2017;140(3):826-842. DOI:
10.1093/brain/aww330

21. Besedovsky HO, Del Rey A, Klusman I, Furukawa H, Monge Arditi G, Kabiersch A (1991) Cytokines as modulators of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 40:613–618 2. Blalock JE (1994) The syntax of immunoneuroendocrine communication. *Immunol Today* 15:504–511)

22. Borsini, F.; Meli, A. (1988). Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity?. *Psychopharmacology* 94 (2). c. 147–160. ISSN 0033-3158. PMID 3127840. doi:10.1007/bf00176837.)

23. Borsini, Franco; Volterra, Giovanna; Meli, Alberto (1986-01-01). Does the behavioral “despair” test measure “despair”?. *Physiology & Behavior* 38 (3). c. 385–386. doi:10.1016/0031-9384(86)90110-1.

24. Castagne V, Moser P, Roux S, Porsolt RD. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Current Protocols in Neuroscience*. 2011; 8(8). DOI:
10.1002/0471142301.ns0810as55

25. Cose S, Brammer C, Khanna KM, Masopust D, Lefrancois L (2006) Evidence that a significant number of naive T cells enter non-lymphoid organs as part of a normal migratory pathway. *Eur J Immunol* 36:1423–1433 6. Hickey WF, Hsu BL, Kimura H (1991) T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* 28:254–260)

26. Cunningham ET Jr, Wada E, Carter DB, Tracey DE, Battey JF, De Souza EB (1992) In situ histochemical localization of type I interleukin-1 receptor messenger RNA in the central nervous system, pituitary, and adrenal gland of the mouse. *J Neurosci* 12:1101–1114)

27. Detke, M. J.; Rickels, M.; Lucki, I. (1995-9). Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology* 121 (1). c. 66-72.)
28. Duzova H. Skeletal muscle, myokines and health. *Medicine Science*. 2012; 1(3): 211-31. DOI: 10.5455/medscience.2012.01.8023
29. Gersner R, Gordon-Kiwkowitz M, Zangen A. Automated behavioral analysis of limbs' activity in the forced swim test. *Journal of Neuroscience Methods*. 2009; 180: 82-6. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2009.03.003
30. Goehler LE, Lyte M, Gaykema RP (2007) Infection-induced viscerosensory signals from the gut enhance anxiety: implications for psychoneuroimmunology. *Brain Behav Immun* 21:721–726 10. Maier SF, Watkins LR (1998) Cytokines for psychologists: implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition. *Psychol Rev* 105:83–107)
31. Hoffmann C, Weigert C. Skeletal Muscle as an Endocrine Organ: The Role of Myokines in Exercise Adaptations. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2017; 7(11). DOI: 10.1101/cshperspect.a029793
32. Jankowsky JL, Patterson PH (1999) Cytokine and growth factor involvement in long-term potentiation. *Mol Cell Neurosci* 14:273–286)
33. Kapilevich LV, Kabachkova AV, Zakharova AN, Lalaeva GS, Kironenko TA, Dyakova EY, et al. Secretory function of skeletal muscles: producing mechanisms and myokines physiological effects. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*. 2016; 47(2): 7-26.
34. Licinio J, Wong ML, Gold PW (1991) Localization of interleukin-1 receptor antagonist mRNA in rat brain. *Endocrinology* 129:562–564)
35. Martino G, Hartung HP (1999) Immunopathogenesis of multiple sclerosis: the role of T cells. *Curr Opin Neurol* 12:309–321 12. Vogt J, Paul F, Aktas O, Muller-Wielsch K, Dorr J, Dorr S, Bharathi BS, Glumm R, Schmitz C, Steinbusch H, Raine CS, Tsokos M, Nitsch R, Zipp F (2009) Lower motor

neuron loss in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol* 66:310–322)

36. Nieman DC, Wentz LM. The compelling link between physical activity and the body's defense system. *The Journal of Sport and Health Science*. 2019; 8(3): 201-17. DOI: 10.1016/j.jshs.2018.09.009

37. O'Neil, K. A.; Valentino, D. (1982-03-12). Escapability and generalization: effect on 'behavioral despair'. *European Journal of Pharmacology* 78 (3). c. 379–380. doi:10.1016/0014-2999(82)90043-7.)

38. Palanki MS, Manning AM. Interleukin-2 inhibitors in autoimmune disease. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 1999; 9(1): 27-39. DOI: 10.1517/13543776.9.1.27

39. Pan W, Kastin AJ (1999) Penetration of neurotrophins and cytokines across the bloodbrain/blood-spinal cord barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 36:291–298)

40. Peake JM, Della Gatta P, Suzuki K, Nieman DC. Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. *Exercise immunology review*. 2015; 21: 8-25. PMID: 25826432

41. Pedersen BK, Akerstrom ThCA, Nielsen AR, Fischer ChP. Role of myokines in exercise and metabolism. *The Journal of Applied Physiology*. 2007; 103: 1093-8. DOI: 10.1152/jappphysiol.00080.2007

42. Pedersen BK, Bruunsgaard H, Ostrowski K, Krabbe K, Hansen H, Krzywkowski K, et al. Cytokines in aging and exercise. *International Journal of Sports Medicine*. 2000; 21(1): 4-9. DOI: 10.1055/s-2000-1444

43. Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiological Reviews*. 2000; 80(3): 1055-81. PMID: 10893431. DOI: 10.1152/physrev.2000.80.3.1055

44. Petitto J.M., Meola D., Huang Z. Interleukin-2 and the brain: dissecting central versus peripheral contributions using unique mouse models. *Methods in Molecular Biology*. 2012;934:301-311. DOI: 10.1007/978-1-62703-071-7_15

45. Petitto JM, Huang Z (2001) Cloning the fulllength IJI-2-2/15 receptor-beta cDNA sequence from mouse brain: evidence of enrichment in hippocampal formation neurons. *Regul Pept* 98:77–87)
46. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatment. *The European Journal of Pharmacology*. 1978; 47(4): 379-91. DOI: 10.1016/0014-2999(78)90118-8
47. Samer El Hayek 1 2, Farah Allouch 2, Luna Geagea 1, Farid Talih 3 4 Interleukin-2 and the Septohippocampal System: An Update on Intrinsic Actions and Autoimmune Processes Relevant to Neuropsychiatric Disorders *Methods Mol Biol* 2019;2011:511-530. doi: 10.1007/978-1-4939-9554-7_30.
48. Schobitz B, Voorhuis DA, De Kloet ER (1992) Localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *Neurosci Lett* 136:189–192)
49. Shurlygina A.V., Galiamina A.G., Melnikova E.V., Panteleeva N.G., Tenditnik M.V., Trufakin V.A., et al. Effects of roncoleukin on immune parameters and mixed anxiety/depression state induced by chronic social defeat stress in male mice. *Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenova*. 2014;100(2):201-214. PMID: 25470897
50. Smith L. L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? / L. L. Smith // *Medicine & Science in Sports & Exercise*. – 2000. – Vol. 32 (2). – P. 317–331.
51. Suckow M.A. *The laboratory mouse* / M.A. Suckow, P.Danneman. - New York: CRC Press, 2001. – 176 с. Режим доступа: http://www.med.unlp.edu.ar/archivos/cicual/the_laboratory_mouse_2001_.pdf
52. Tang Q. Therapeutic Window of Interleukin-2 for Autoimmune Diseases. *Diabetes*. 2015; 64: 1912-3. DOI: 10.2337/db15-0188
53. Zalcman S., Murray L., Dyck D.G., Greenberg A.H., Nance D.M. Interleukin-2 and -6 induce behavioral-activating effects in mice. *Brain Research*. 1998;811(1-2):111-121. DOI: 10.1016/s0006-8993(98)00904