

УДК 612;591.1, 796.015.6 : 577.175.1 : 612.017
№ держреєстрації: 0119U101093

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

вул. Шевченка, 14, м. Івано-Франківськ, 76000. Тел. +380963102636;
e-mail: office@ksu.ks.ua; <http://www.kspu.edu>

ЗАТВЕРДЖУЮ

Ректор Херсонського
державного університету

Олександр СПІВАКОВСЬКИЙ
22 серпня 2024 року



ЗВІТ ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

**АДАПТАЦІЙНІ ПРОЦЕСИ ОРГАНІЗМУ В УМОВАХ ЦИТОКІНОВОГО
НАВАНТАЖЕННЯ
(остаточний)**

Перший проректор
д.пед.н., професор

Науковий керівник НДР
к.б.н., доцент

Сергій ОМЕЛЬЧУК

Олена ГАСЮК

Івано-Франківськ – Херсон

2024

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, к.б.н.,
завідувачка кафедри біології
людини та імунології, доцентка



О. М. Гасюк
(Вступ, Розділ 1, 3,
висновки)

Відповідальний виконавець
викладачка кафедри біології
людини та імунології



В.А. Швець
(Розділ 2, 3, список
літературних джерел)

Відповідальний виконавець
доцент кафедри біології
людини та імунології



С.П. Бесчасний
(Розділ 3, висновки)

АНОТАЦІЯ

Цитокіни мають широкий спектр дії на організм. Важливо поглибити знання про роль цитокінового каскаду в реалізації адаптаційних змін в організмі, що допоможе у визначенні особливостей функціонування нейрон-імуно-гуморальної системи регуляції і уточнити їх роль та значення, так як є ймовірність їх негативного впливу.

Об'єкт дослідження – адаптаційні процеси організму білих лабораторних мишей.

Предмет дослідження – окремі показники периферичної крові та функціонування нервової системи в умовах цитокінового навантаження.

Методи дослідження. Для виконання поставлених завдань та досягнення мети використовувалися наступні методи: аналізуючи сучасні наукові дані та результати експериментальних досліджень, біохімічні методи, методи математичної статистики

Отримано нові дані для розуміння фізіологічних механізмів адаптації організму ссавців, для виявлення характеру напруження функціональних систем, особливості якого детермінують утворення внутрішньосистемних та міжсистемних зв'язків. Показано, що досліджувані речовини змінюють лейкоцитарну формулу та біохімічний склад ефektorних клітин периферичної крові. За результатами дослідження встановлено, що окремі цитокіни в різних концентраціях чинить неоднаковий вплив на поведінкові прояви дослідних тварин, що є підтвердженням їх дозозалежності. Отримані дані потребують подальшої розробки та уточнення. Отримані результати дозволять не лише покращити існуючі методи лікування, але й розробити нові підходи до терапії захворювань, асоційованих з дисбалансом цитокінової регуляції.

Ключові слова: цитокіни, цитокінове навантаження, адаптація, поведінкові реакції, периферична кров, морфологічні показники.

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

ANNOTATION

Cytokines have a wide range of effects on the body. It is important to deepen knowledge about the role of the cytokine cascade in the implementation of adaptive changes in the body, which will help in determining the features of the functioning of the neuron-immune-humoral system of regulation and to clarify their role and significance, as there is a possibility of their negative impact.

The object of research is adaptation processes of the body of white laboratory mice.

The subject of the study is individual indicators of peripheral blood and functioning of the nervous system in conditions of cytokine load.

Research methods. To fulfill the tasks and achieve the goal, the following methods were used: analyzing modern scientific data and the results of experimental studies, biochemical methods, methods of mathematical statistics

New data were obtained to understand the physiological mechanisms of adaptation of the mammalian organism, to reveal the nature of the tension of functional systems, the features of which determine the formation of intrasystemic and intersystemic connections. It was shown that the studied substances change the leukocyte formula and the biochemical composition of effector cells of peripheral blood. According to the results of the study, it was established that individual cytokines in different concentrations have different effects on the behavioral manifestations of experimental animals, which is a confirmation of their dose dependence. The obtained data require further development and clarification. The obtained results will allow not only to improve the existing methods of treatment, but also to develop new approaches to the therapy of diseases associated with an imbalance of cytokine regulation.

Key words: cytokines, cytokine load, adaptation, behavioral reactions, peripheral blood, morphological indicators.

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. Огляд літературних джерел.....	9
1.1. Цитокіни: загальна характеристика.....	9
1.2. Рецептори до цитокінів	15
1.3. Реакції в організмі, опосередковані цитокінами.....	19
1.4. Роль інтерлейкінів в організмі	25
РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи дослідження.....	29
2.1. Організація експериментального дослідження	29
2.2. Методи експериментального дослідження	30
РОЗДІЛ 3. Аналіз та обговорення отриманих результатів	32
3.1. Показники крові експериментальних тварин.....	32
3.1.1. Стан лейкограми досліджуваних тварин,.....	32
3.1.2. Дослідження цитохімічних показників крові	36
3.2. Дослідження поведінки дослідних тварин за методикою «відкрите поле».....	44
3.3. Оцінка фізичної витривалості мишей за результатами тесту Порсолта (примусове плавання з вантажем).....	47
ВИСНОВКИ.....	50
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	51

ВСТУП

Організм людини володіє потужною системою саморегуляції, здатною адаптуватися до різноманітних факторів зовнішнього середовища. Одним із ключових механізмів адаптації є цитокінова система, яка відіграє важливу роль у відповіді на інфекції, травми та інші стресові фактори.

Тож, цитокіни відіграють ключову роль у регуляції імунної відповіді організму, забезпечуючи комунікацію між клітинами та координацію їхніх дій, включаючи активацію імунних клітин, регуляцію запальних реакцій, стимуляцію регенеративних процесів.

Однак, надмірне виділення цитокінів, відоме як цитокіновий шторм (цей стан характеризується масованим викидом цитокінів), може призвести до серйозних патологічних станів, включаючи системний запальний синдром і органну недостатність. У таких умовах організм повинен активувати складні адаптаційні процеси для підтримання гомеостазу та мінімізації пошкоджень тканин.

Адаптаційні процеси включають зміну метаболічних шляхів, активацію антиоксидантних систем, регуляцію апоптозу та аутофагії, а також модулювання імунної відповіді. Розуміння цих механізмів є критично важливим для розробки нових,

Розуміння механізмів адаптаційних процесів організму в умовах цитокінового навантаження має важливе значення для розробки нових терапевтичних стратегій, спрямованих на зниження негативних наслідків цитокінового навантаження та дисбалансу цитокінової системи.

Актуальність даного дослідження полягає у спрямованості на розгляд ключових аспектів адаптаційних процесів організму в умовах цитокінового навантаження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами. Робота є завершальним звітом за науково-дослідною темою “Адаптаційні процеси організму в умовах цитокінового навантаження” (державний реєстраційний номер 0119U101093).

Мета дослідження. виявлення плейотропних ефектів деяких про- та протизапальних цитокінів у перебігу адаптаційних процесів організму білих лабораторних мишей.

Для досягнення мети були поставлені та вирішені наступні *завдання дослідження*:

- Створити модель цитокінового навантаження;
- Вивчити морфофункціональні особливості периферичної крові білих мишей в умовах дії цитокінового навантаження;
- Оцінити реакції на фізичне навантаження в умовах дії цитокінового навантаження т ;
- Дослідити вплив цитокінової стимуляції на поведінкові реакції.

Об'єкт дослідження – адаптаційні процеси організму білих лабораторних мишей.

Предмет дослідження – окремі показники периферичної крові та функціонування нервової системи в умовах цитокінового навантаження.

Методи дослідження. Для виконання поставлених завдань та досягнення мети використовувалися наступні методи: аналізуючи сучасні наукові дані та результати експериментальних досліджень, біохімічні методи, методи математичної статистики

Наукова новизна одержаних результатів. Отримано нові дані для розуміння фізіологічних механізмів адаптації організму ссавців, для виявлення характеру напруження функціональних систем, особливості якого детермінують утворення внутрішньосистемних та міжсистемних зв'язків. Показано, що досліджувані речовини змінюють лейкоцитарну формулу та біохімічний склад ефекторних клітин периферичної крові. За результатами дослідження встановлено, що окремі цитокіни в різних концентраціях чинить неоднаковий вплив на поведінкові прояви дослідних тварин, що є підтвердженням їх дозозалежності. Отримані дані потребують подальшої розробки та уточнення,

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати дозволять не лише покращити існуючі методи лікування, але й розробити нові

підходи до терапії захворювань, асоційованих з дисбалансом цитокінової регуляції. Також отримані результати доцільно використовувати у навчальному процесі, інтегрувавши у структуру таких навчальних компонент як «Імунологія» та «Фізіологія людини і тварин».

Апробація результатів дослідження. Основні положення науково-дослідної роботи викладено у 2 науково-методичному посібниках, 4 статтях категорії Б та у 1 тезах. У ході проведених досліджень виконано і захищено 3 кваліфікаційні роботи. Результати досліджень обговорювалися під час виступів на наукових конференціях різного рівня.

Робота складається із вступу, трьох розділів, висновків, списку використаних джерел, ілюстрована 28 рисунками та 5 таблицями.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1.1. Цитокині: загальна характеристика

Цитокині, яких наразі відомо понад 130, є ключовими сигнальними білками з малою молекулярною масою (<30 кДа), які модулюють клітинну активність у імунитеті, інфекції, запаленні та про розвитку злоякісних пухлин [2]. Цитокині - це розчинні позаклітинні білки або глікопротеїни, які є ключовими міжклітинними регуляторами та мобілізаторами клітин, задіяних у вроджених, а також адаптивних запальних захистах господаря, клітинному рості, диференціації, клітинній смерті, ангіогенезі та процесах розвитку та відновлення, спрямованих на відновлення гомеостазу. На середину двотисячних структуру цитокінів, уявляли подібним чином (рис. 1.1), а згодом постійно вносилися окремі зміни та доповнення [17, 37].

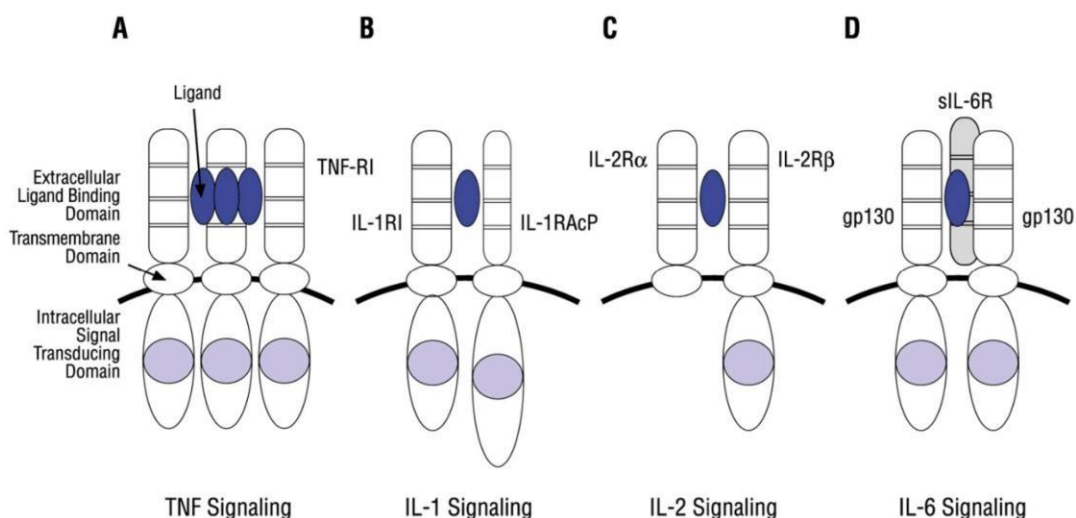


Рис. 1.1. Чотири приклади цитокінів та їх рецепторів (за Dinarello CA., 2007) [7]

Цитокині еволюціонували з найдавніших форм у вигляді внутрішньоклітинних молекул до появи рецепторів і сигнальних каскадів. Цитокіноподібні речовини були продемонстровані у безхребетних, таких як риби-зірки та дрозофіли, де вони відіграють важливу роль у захисті та

відновленні організму. Цитокінопосередковане підвищення температури тіла як механізм виживання було продемонстровано у пойкилотермних ящірок [3]. Було зроблено кілька дивовижних відкриттів щодо віку цитокінів та їхніх рецепторів. Наземні саламандри використовують цитокін, споріднений інтерлейкіну-6, як феромон [48]. Свідченням того, що цитокіти розвинулися в процесі еволюції набагато раніше, ніж з'явилися хребетні, стало те, що одна JAK-кіназа та єдиний фактор STAT розташовані в геномі дрізофіли. Крім того, було показано, що слизовики *Dictostelium discoides* експресують білки STAT, що можна вважати ознакою того, що походження цитокінів лежить перед багатоклітинними організмами [41].

Деякі цитокіни функціонують як фактори транскрипції (ймовірно, їхні початкові функції), а також як позаклітинні ліганди для специфічних рецепторів, які будуть розвинуті пізніше [7].

Більшість цитокінів найкраще визначити як розчинні фактори, що виробляються однією клітиною та діють на іншу клітину. Однак сьогодні ми визнаємо, що цитокіни також можуть функціонувати як інтегральні мембранні білки, і деякі з них ніколи не вивільняються з клітини [7].

Спочатку вважалося, що цитокіни в основному беруть участь у координації імунних функцій, але виявилось що вони також беруть участь у координації функцій нервової системи [31, 32].

З початку ери вивчення цитокінів існує багато спроб їх класифікувати. Труднощі цієї колосальної роботи неважко зрозуміти, враховуючи величезну кількість неточно визначених «факторів», виявлених у перші роки, а також лавиноподібне накопичення інформації про функції та хвороби, індуковані цитокінами [37].

Ключем до розуміння їхньої функції є визнання їх плеiotропізму та «функціональних надмірностей», які часто перекриваються та певним чином дублюють одне одну. Класифіковані тут на 9 основних груп, більшість із 20 схвалених цитокінових препаратів (18 різних цитокінів; 3 пегільованих), усі у рекомбінантній людській (rh) формі, згруповані в гемопоетичний фактор росту, інтерферон, тромбоцитарний фактор росту (PDGF) і трансформуючий фактор

росту β (TGF β). У сімействі гемопоетину затвердженими цитокинами є альдеслейкін (rhIL-2), опрелвекін (rhIL-11), філграстим і тбо-філграстим (rhG-CSF), сарграмостим (rhGM-CSF), метролептин (rh-лептин) і rh- еритропоетини, епоетин і дарбепоедин α . Анакінра, антагоніст рекомбінантного рецептора IL-1, належить до сімейства IL-1; рекомбінантні інтерферони α -1, α -2, бета-1 і гамма-1 складають сімейство інтерферонів; паліфермін (rhKGF) і бекаплермін (rhPDGF) належать до сімейства PDGF; і rhBMP-2 і rhBMP-7 представляють сімейство TGF β . Представлено основні фізико-хімічні властивості, схвалені FDA показання, механізми дії та побічні ефекти цих схвалених цитокінів. В основі кожного профілю несприятливих подій лежить їх плейотропізм, потужність і здатність вивільняти інші цитокини, що утворюють «коктейлі» цитокінів. Побічні ефекти (деякі досить серйозні) виникають, незважаючи на те, що цитокини є ендogenous білками, і тому це вимагає обережності при спробах застосування їх у клінічній практиці. Ця обережність відображається у відносно невеликій кількості цитокінів, які наразі схвалені регулюючими органами, і в тому факті, що 14 препаратів, схвалених FDA, містять попередження, а 10 є з попередженнями про ефект «чорної скриньки» [2].

Залежно від біологічних ефектів цитокини можна розділити на шість основних груп: інтерлейкіни (IL), хемокіни, інтерферони (INF), фактори некрозу пухлин (TNF), фактори росту гемопоезу та трансформуючий фактор росту β (TGF). TGF - β) члени родини. Основні класи цитокінів представлено у таблиці 1.1.

Тож, цитокини можна розділити на функціональні класи. Наприклад, деякі цитокини є переважно факторами росту лімфоцитів, інші функціонують як прозапальні або протизапальні молекули, тоді як інші цитокини поляризують імунну відповідь на антиген. Протягом останніх 45 років цитокини стали важливим рубежем у медицині як діагностичні, прогностичні та терапевтичні засоби. Хоча сьогодні цитокини вивчаються майже в усіх біологічних дисциплінах, опосередковані цитокинами ефекти домінують у сферах запалення, імунології, атеросклерозу та раку.

Базова класифікація цитокінів (за Kupsa, Tomáš & Horacek, Jan M & Jebavy, Ladislav, 2012) [22]

Cytokine family	Functional subgroups	Physiologic effect
Interleukins	IL-3, IL-7, Flt3-ligand	- stimulate hematopoiesis
	IL-1, IL-6	- pluripotent, inflammatory
	IL-2, IL-4, IL-5, IL-12, IL-13	- regulate T and B cell cooperation
Chemokines	α : CXC	- regulate migration of granulocytes and lymphocytes
	β : CC	- promote angiogenesis and inflammation
	γ : C, δ : CX ₃ C	- regulate migration of monocytes - enable medullar homing - regulate migration of lymphocytes
Interferons	Type I: INF α , β , ω	- antiviral immunity - anti-proliferative effect
	Type II: INF γ	- antitumorous activity - response to intracellular pathogens
Tumor necrosis factors	TNF α :	- pro-inflammatory pyrogenic - activates non-specific immunity - adhesive molecule expression on endothelial surface - may cause apoptosis - - overproduction causes SIRS
	TNF β :	- similar in effect, but produced by T- and B lymphocytes
Colony Stimulating Factors	G-CSF, GM-CSF, M-CSF Erythropoietin Thrombopoietin	- stimulate proliferation and maturation of myeloid precursors
TGF- β		- stimulate growth of fibroblasts and extracellular matrix production - lead to MMPs inhibition

Modified from: (ref. ²¹)

Наприклад, хемокіни та їхні рецептори впливають на запалення, патогенез ВІЛ-1, переміщення лімфоцитів та аутоімунні захворювання. Деякі хронічні захворювання, здається, викликані «автозапальними» шляхами, тоді як інші мають класичні характеристики «аутоімунних» механізмів. Мутації в гені NALP1 пов'язані з аутоімунними захворюваннями [19], тоді як мутації в NALP3 пов'язані з автозапальними захворюваннями [16].

Інший цитокін, фактор некрозу пухлин (TNF), має багато спільних функціональних властивостей з інтерлейкінами. IL-1 і TNF є структурно різними глікопротеїнами, які синтезуються тими самими клітинами та поведуться подібним чином [33].

Хоча в цій класифікації існують певні збіги і повтори, на основі досліджених функцій «інфламмасоми» каспази-1 виникли різні профілі цитокінів. Відкриття поверхневих Toll-подібних рецепторів (TLR) у ссавців для розпізнавання великої та гетерогенної кількості мікробних продуктів є невід'ємною частиною біології цитокінів, оскільки внутрішньоклітинні сигнальні домени TLR майже ідентичні доменам рецептора інтерлейкіну-1, обидва посередники господаря реакції на інфекцію та травму (рис. 1.2) [7].

Клітини, які синтезують ці молекули, - це макрофаги та ендотеліальні клітини. Після бактеріальної інвазії макрофаги розпізнають зловмисників, активуються та виділяють IL-1 і TNF. Ці гормони змінюють оболонку кровоносних судин, активують Т-клітини та циркулюють у мозку. У мозку IL-1 і TNF сприяють синтезу ліпиду під назвою простагландин E2, який змінює нашу внутрішню регуляцію температури тіла [33].

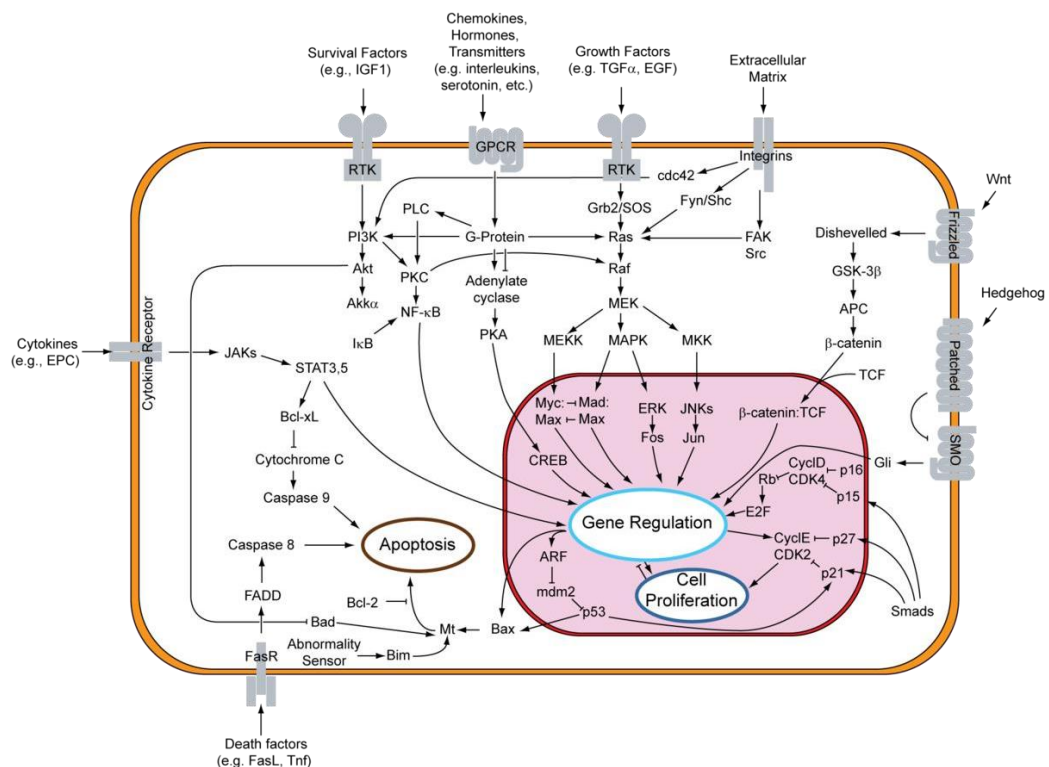


Рис 1.2. Активація цитокінами вторинних месенджерів [34]

Важливою проблемою при дослідженні цитокінів є їх виявлення та точна лабораторна діагностика. На практиці точне виявлення цитокінів є складним завданням через їх слідові кількості (діапазон pm) в організмі, їх динаміка процеси секреції і короткий період напіврозпаду [54]. Цитокіни утворюють

складні мережі, які служать для модуляції імунних процесів; різні цитокіни можуть мати антагоністичний, адитивний або синергетичний вплив на той самий біологічний процес. Через надзвичайну складність мережі вимірювання цитокінів у реальному часі під час їх реакції на навколишнє мікроклітинне середовище залишається проблемою [35]. Найбільш часто використовуваними методами кількісного визначення цитокінів є твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA) і полімеразна ланцюгова реакція (PCR) [43]. Але ці методи доволі трудоміські та дорогі, тож все більше застосування набувають біосенсиори [27]. Поточні дослідження присвячені розробці біосенсорів, таких як імуносенсиори для виявлення цитокінів від внутрішньоклітинних до позаклітинних областей, особливо в діагностиці інфекційних захворювань і скринінгу наркотиків [60]. Різноманітність платформ біосенсору для кількісного визначення цитокінів, починаючи від сендвіч-імуносенсорів [59] до аптасенсорів, наносенсорів імплантованих медичних пристроїв, моніторингу *in vivo* в реальному часі та від внутрішньоклітинного біозображення до позаклітинного виявлення [10, 25, 26, 27, 28].

Цитокіни спричинили революційний вплив на наше розуміння клітинних функцій і позаклітинного обміну, але їхні біологічні ефекти, здається, пропонують великий потенціал подальших досліджень. Особливо це стосується застосування для лікування широкого спектру патологічних станів людини. Але їх плеiotропізм, потужність і складність утворення «коктейлів» цитокінів з сигнальними каскадами та супутніми побічними ефектами вимагає обережності при спробах введення окремих членів цієї родини у клініку. Ряд біологічних подій, що запускаються навіть окремими цитокінами, попереджає про можливість небажаних побічних ефектів [2].

Наприклад, альдеслейкін (рекомбінантний IL-2) є потужним активатором Т-лімфоцитів і стимулює імунну відповідь на рак, викликаючи регресію пухлин у метастатичній нирково-клітинній карциномі та меланомі, Однак це може призвести до ряду несприятливих серцевих і легневих наслідків. Можливо, найкращим прикладом невизначеності щодо безпеки та співвідношення користі та ризику, пов'язаного з цитокінами, є кісткові морфогенетичні білки BMP-2 та

ВМР-7. У постмаркетинговому періоді ці фактори росту в даний час знаходяться в центрі уваги та спекуляцій як потенційні канцерогени. Рецептори ВМР-2 експресуються на деяких пухлинних клітинах, і повідомлялося про збільшення частоти раку після його використання. Доза конкретного цитокіну також може мати вирішальне значення для уникнення небезпечних побічних ефектів, звужуючи спектр активності плеїотропного агента та схиляючи баланс до конкретної біологічної активності [51].

Цитокіни справді іноді можуть провокувати широкий діапазон і кількість токсичних і побічних явищ, але, загалом, друга сторона їхнього плеїотропізму зазвичай більш ніж компенсує профілі побічних ефектів, і це відображається в їх списках показань і затвердженому нормативному статусі. Фактично, у деяких випадках токсичність відповідає покращенню результатів. Наприклад, при оцінці значущості аутоіmunітету у пацієнтів з меланою, які отримували інтерферон α -2b, було виявлено, що індукований інтерфероном аутоіmunітет є прогностичним маркером покращення безрецидивного та загального виживання [12, 25].

1.2. Рецептори до цитокінів

Особливості рецепторів до цитокінів зумовлюють як прямі, так і плеїотропні ефекти цих речовин. Наразі вже відкрита значна кількість таких рецепторів і їх кількість постійно зростає (рис. 1.3). На рисунку зображені класи рецепторів, які широко поділяються на основі гемопоетичних (тип I) та рецепторів цитокінів інтерферону (IFN) (тип II).

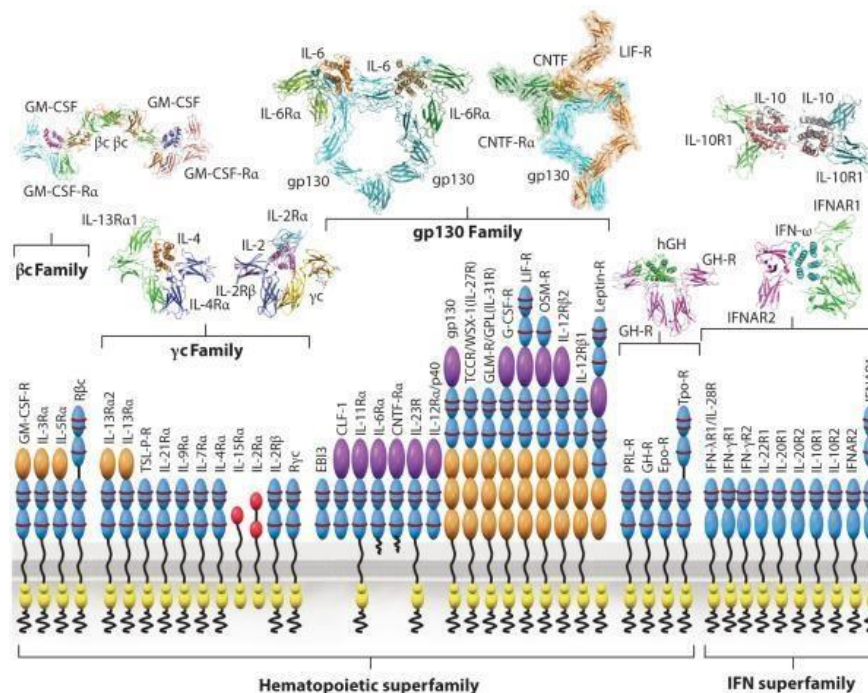


Рис. 1.3. Структурна таксономія рецепторів цитокінів та їх відповідних сигнальних комплексів (за Spangler JB, Moraga I, Mendoza JL, Garcia KC., 2015) [46]

Скорочення: GM-CSF, колонієстимулюючий фактор гранулоцитарних макрофагів; CNTF, циліарний нейротрофічний фактор; hGH, людський гормон росту.

Цитокіни типу I додатково поділяються на основі трьох основних спільних сімейств рецепторів (β c, γ c і gp130). Ділянки гомології зв'язування цитокінів (CHR), що складаються з тандемних доменів фібронектину III типу (FNIII), пофарбовані синім кольором на рецепторах. Структури демонструють збереження модуля комплексу цитокін-CHR у всіх системах, а також відмінність загальних структур комплексу. Представлені структури є рецепторними комплексами для GM-CSF [46]; IL-4 та IL-2 [24, 52]; IL-6 [44] і CNTF [45], обидва зібрані з компіляції даних рентгенівської дифракції та електронної мікроскопії; hGH (32); IL-10; та ІФН типу I.

Хоча кожна система цитокінів має унікальні властивості, існують конвергентні молекулярні та структурні принципи, які слід враховувати при проведенні експерименту з інженерії цитокінів [52]. Парадигма сигналізації рецепторів цитокінів здійснюється за допомогою ліганд-опосередкованої

димеризації або ліганд-опосередкованої реорганізації попередньо сформованих димерів рецепторів. Незалежно від того, чи існують рецептори цитокінів у вигляді попередньо сформованих димерів у нелігандованому стані, як припускають деякі дослідження [20], сигнальний комплекс вимагає одночасного зв'язування двох JAK-асоційованих субодиниць рецептора з цитокіном для активації сигналізації (рис. 1.4).

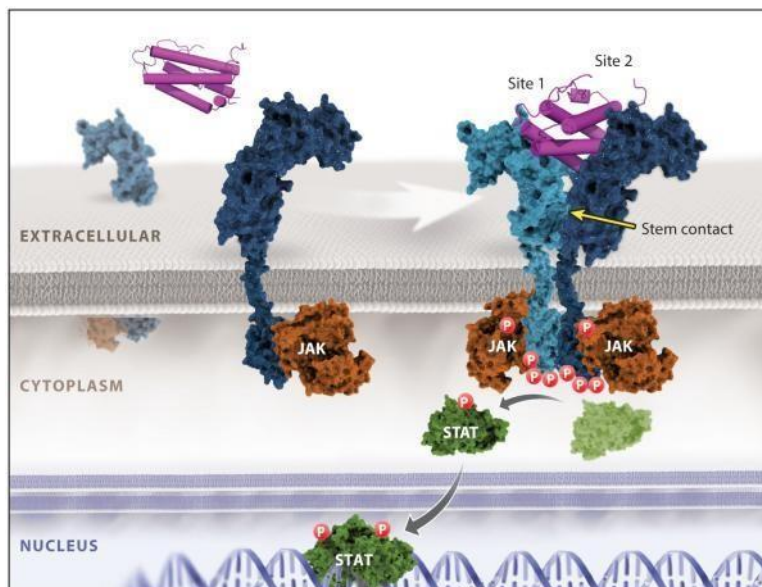


Рис. 1.4. Залучення цитокінового рецептора до ліганду, димеризація та передача сигналів (за Spangler JB, Moraga I, Mendoza JL, Garcia KC., 2015) [46]

Парадигма димеризації також очевидна для рецепторів тирозинкінази (RTK), і, мабуть, по суті всі односторонні трансмембранні рецептори вимагають деякої форми ліганд-опосередкованої олігомеризації або реорганізації для ініціювання сигналізації [23]. Деякі цитокіни, такі як людський гормон росту (hGH), еритропоєтин (EPO) та тромбопоєтин (TPO), гомодимеризують дві ідентичні копії своїх рецепторів. Однак переважна більшість цитокінів утворюють гетеродимерні рецепторні комплекси, що містять загальну субодиницю рецептора, наприклад, загальний гамма-ланцюг (γ c), gp130, загальний бета-ланцюг (β c) разом з ліганд-специфічною субодиницею, IL-6R α , IL-3R α . Цитокіни використовують сторони своїх спіральних поверхонь для взаємодії з петлями, що проектуються зі з'єднаних доменів фібронектину типу III (FNIII), що включають цитокін-зв'язувальні гомологічні регіони (CHR)

ланцюгів рецепторів. Ранні структурні дослідження в системі hGH встановили цю особливість, а також архітектуру зв'язування сайту 1/сайту 2 [52], в якій цитокін зв'язується з першою субодиницею рецептора через сайт 1, а потім рекрутує другу субодиницю рецептора через сайт 2. Кожна структура комплексу Цитокін-рецептор демонструє деяку подобу цього базового архітектурного будівельного блоку (див. рис. 1.3) [46].

Цитокіни можна класифікувати за типом рецептора, який вони залучають. На основі загальних структурних особливостей рецептори цитокінів згруповані в шість основних сімейств: рецептори цитокінів класу I, рецептори цитокінів класу II, рецептори TNF, рецептори IL-1, рецептори тирозинкінази та хемокінові рецептори.

Рецептори цитокінів класу I, також відомі як рецептори гемопоетину, складають найбільшу групу серед сімейства рецепторів цитокінів. Це мембранні білки типу I з N-кінцевою позаклітинною та C-кінцевою внутрішньоклітинною орієнтацією. Позаклітинні сегменти рецепторів цитокінів класу I демонструють модульну архітектуру, яка характеризується ділянкою гомології зв'язування цитокінів (CHR) ~200 залишків, що має класичний мотив зв'язування для цитокінів. Модуль CHR складається з двох доменів фібронектину типу III (FNIII), з'єднаних лінкером, і він представляє модуль розпізнавання сигнатур для спіральних цитокінів, присутніх на кожному рецепторі цитокінів типу I. Верхній N-кінцевий домен містить чотири консервативних залишки цистеїну, які утворюють міжланцюгові дисульфідні зв'язки. Нижній C-кінцевий домен має збережений мотив Trp-Ser-X-Trp-Ser. Дослідження мутагенезу показали істотну структурну роль цих амінокислот у підтримці третинної структури білка, але вони не беруть участі у взаємодії цитокінів [56]. Ці ознаки послідовності та структурні особливості були використані для ідентифікації нових цитокінових рецепторів у кількох геномах [47]. Сайт зв'язування цитокінів для більшості модулів CHR знаходиться на вершині ліктьової області, що складається в основному з міжланцюгових петель, що з'єднують β -ланцюги як з N-, так і з C-кінцевих доменів. Базовий модуль CHR присутній у кожному цитокіновому рецепторі класу I, і для

деяких, таких як рецептори hGH і еритропоєтину (EPO), одного CHR достатньо для опосередкування зв'язування ліганду та гомодимеризації рецептора [29]. Однак багатьом іншим рецепторам цитокінів класу I потрібні додаткові домени, такі як Ig-подібний домен і додаткові домени проксимального мембрани фібронектину, знайдені в родині gp130, щоб функціонувати та відповідати на цитокіни. α -рецептори IL-2 та IL-15 сімейства γ є атиповими рецепторами цитокінів, оскільки вони не містять CHR [30, 52].

1.3. Реакції в організмі, опосередковані цитокінами

Запалення є ключовим компонентом захисту господаря. Однак надмірне або стійке запалення може сприяти патогенезу захворювання. Запалення частково регулюється цитокінами, які є невеликими, як правило, глікозильованими білками, які взаємодіють з мембранними рецепторами для регулювання клітинних процесів, таких як проліферація, диференціювання та секреція. Протягом останніх 30 років дослідження на людях і піддослідних тваринах продемонстрували, що цитокін під назвою фактор некрозу пухлини α (TNF- α) відіграє ключову роль у ініціації запальних реакцій у легенях та інших тканинах, включаючи запалення в результаті вдихання шкідливих речовин. частинки. Зараз є переконливі докази того, що одним із шляхів, за допомогою якого вдихувані частинки стимулюють залучення та подальшу активацію запальних клітин, є активація легеневих макрофагів для вивільнення TNF- α . Потім TNF- α діє за допомогою паракринних і аутокринних шляхів, щоб стимулювати клітини до вивільнення інших цитокінів, відомих як хемокіни, які мають пряму хемотаксичну дію на лейкоцити та інші клітини, які беруть участь у реакціях запалення та загоєння ран. На додаток до TNF- α -опосередкованого шляху, є все більше доказів того, що деякі частинки, такі як кварц і крокидоліт, можуть безпосередньо активувати легеневі епітеліальні клітини для вивільнення хемокінів, таких як макрофагальний запальний білок-2, індукований цитокінами хемоаттрактант нейтрофілів та IL-8. Пряма стимулююча дія частинок на епітелій легень може являти собою додатковий

або альтернативний шлях, за допомогою якого вдихувані частинки можуть викликати запалення в легенях. Недавні дослідження показали, що окислювальний стрес може бути компонентом механізму, за допомогою якого частинки активують вироблення цитокінів у таких клітинах, як макрофаги та епітеліальні клітини. Внесок окислювального стресу в індуковану частинками експресію гена цитокінів, як видається, опосередковується, принаймні частково, через активацію ядерного фактора каппа В фактора транскрипції [7].

По відношенню до запалення, а точніше, зп ознакою розвитку або пригнічення цієї генералізованої реакції, цитокіни поділяють на дві великі групи: прозапальні та протизапальні.

Основні протизапальні цитокіни, цитокінові рецептори та інгібітори цитокінів наведені в таблицях 1.2, та 1.3.

Таблиця 1.2

Основні протизапальні цитокіни [36]

Cytokines	Cellular Sources	Major Activities
IL-1ra	Monocyte/macrophage dendritic cells	Specific inhibitor of IL-1a- and IL-1b-mediated cellular activation at the IL-1 cellular receptor level
IL-4	T cells (Th2), mast cells, B cells, stromal cells	Promotes Th2 lymphocyte development; inhibition of LPS-induced proinflammatory cytokine synthesis
IL-6	polymorphonuclear cell, monocytes, T, B cells,	Inhibition of TNF and IL-1 production by macrophages
IL-10	Monocyte/macrophage, T cells (Th2), B cells	Inhibition of monocyte/macrophage and neutrophil cytokine production and inhibition of Th1-type lymphocyte responses
IL-11	Stromal cells, fibroblasts	Inhibits proinflammatory cytokine response by monocyte/macrophages and promotes Th2 lymphocyte response
IL-13	T cells (Th2)	Shares homology with IL-4 and shares IL-4 receptor; attenuation of monocyte/macrophage function
TGF-b	Constitutively expressed in many cell lines	Inhibition of monocyte/macrophage MHC class II expression and proinflammatory cytokine synthesis

Рецептори протизапальних цитокінів [36]

Soluble Receptor	Cellular Sources	Major Activities
Soluble TNF receptor p55 (sTNFRp55)	Multiple cell lines	Binds to TNF trimers in the circulation, preventing membrane-bound TNF receptor–TNF ligand interactions
Soluble TNF receptor p75 (sTNFRp75)	Multiple cell lines	Binds to TNF trimers in the circulation, preventing membrane-bound TNF receptor–TNF ligand interactions
Soluble IL-1 receptor type 2 (sIL-1RII)	B cells, neutrophils, bone marrow precursors	Binds to circulating IL-1 ligands in the plasma, preventing IL-1b from binding to the IL-1 receptor type 1
Membrane-bound IL-1 receptor type 2 (mIL-1RII)	B cells, neutrophils, bone marrow precursors	Decoy receptor that lacks intracellular signaling function and competes with type 1 IL-1R for IL-1 ligand binding at the cell membrane
IL-18 binding protein (IL-18BP)	Splenocytes, multiple other cell lines	Soluble extracellular domain of IL-18 receptor that functions as a decoy receptor and binds circulating IL-18

Фізіологічна роль протизапальних цитокінів та інгібіторів цитокінів полягає в тому, що у відповідь на системний імунний виклик, генерується складна мережа цитокінів. Чистий ефект взаємодії між прозапальними та протизапальними молекулами з часом визначає природу імунної відповіді в окремих індивідів [8, 57].

Запальні реакції в периферичній і центральній нервовій системах відіграють ключову роль у розвитку та стійкості багатьох патологічних станів. Відомо, що певні запальні цитокіни в спинному мозку, дорзальному корінцевому ганглії (DRG), пошкоджені нерви або шкірі пов'язані з больовою поведінкою та генерацією аномальної спонтанної активності від пошкоджених нервових волокон або стиснутих/запалених нейронів DRG [53].

Цитокіни виробляються багатьма популяціями клітин, але переважаючими

продуцентами є хелперні Т-клітини (Th) і макрофаги.

Цитокіни можуть вироблятися в периферичній нервовій тканині та в ній під час фізіологічних і патологічних процесів резидентними та рекрутованими макрофагами, тучними клітинами, ендотеліальними клітинами та клітинами Шванна. Після пошкодження периферичного нерва макрофаги та клітини Шванна, які збираються навколо ушкодженої ділянки нерва, виділяють цитокіни та специфічні фактори росту, необхідні для регенерації нерва [13]. Локалізоване запальне подразнення дорзального корінцевого ганглія (DRG) не тільки підвищує прозапальні цитокіни, але також знижує протизапальні цитокіни. Цитокіни також можуть синтезуватися та вивільнятися з грижі пульпозного ядра, синтезованого всередині спинного мозку, соми DRG або запаленої шкіри [55].

Крім того, цитокіни можуть ретроградно транспортуватися з периферії через аксональні або неаксональні механізми до DRG і дорсального рогу, де вони можуть мати глибокий вплив на нейрональну активність [38] і, отже, сприяти етіології різних патологій [58].

Ще одною глобальною реакцією організму, де беруть участь цитокіни, є сепсис. Сепсис являє собою сукупність клінічних ознак і симптомів, що виникають в результаті занадто сильного системного запалення. Ця реакція в значній мірі осередкована цитокінами, які вивільняються в системному кровотоці. Концентрації в плазмі специфічних цитокінів, TNF α , IL-1 β , IL-6 та IL-8 часто підвищуються при сепсисі у людей, а концентрація цитокінів корелює з важкістю перебігу та наслідками сепсису. Крім прозапальних цитокінів, при сепсисі у великих кількостях також виробляються розчинні рецептори цитокінів, антагоністи рецепторів цитокінів і протизапальні цитокіни. Складна взаємодія цитокінів і нейтралізуючих їх молекул визначає клінічну картину і перебіг сепсису [4, 46].

В останні роки значну увагу привертає таке явище, як цитокіновий шторм. Різні збудники, аутоімунні та злоякісні захворювання [15], а також генетичні розлади та певні терапевтичні втручання можуть призвести до небезпечних для життя системних запальних синдромів в організмі людини. Їх спільною

ознакою є масоване виділення цитокінів через надмірну активацію імунних клітин. Ця нерегульована запальна реакція призводить до самопідсилення зворотного зв'язку і може бути небезпечною для життя господаря [18]. Зазвичай, такі стани називають синдромом вивільнення цитокінів (CRS) або, у важких випадках, цитокіновим штормом (CS). Термін CRS запропонований L. Chatenoud, який використав його в 1991 році для опису індукованого муромонабом анти-CD3 синдрому в умовах імуносупресивної терапії при трансплантації органів [5]. CS часто виникає в контексті певних захворювань, синдромів і методів лікування, наприклад, анафілаксії, реакції «трансплантат проти господаря», синдрому гострого респіраторного дистрес-синдрому і синдрому системної запальної відповіді [42]. Цитокіновий шторм означає переважну імунну відповідь, що характеризується виділенням цитокінів, включаючи інтерлейкіни, інтерферони, хемокіни та інші медіатори (табл. 1.4).

Таблиця 1.4

Роль цитокінів у виникненні цитокінового шторму [18]

Mediator	Main Source	Major Function
Cytokines		
IL-1	macrophages, pyroptotic cells, epithelial cells	Proinflammatory; pyrogenic function; activation of macrophage and TH17 cells
IL-2	T cells	Immune response; Teff and Treg cell growth factor; T-cell differentiation
IL-4	TH2 cells, basophils, mast cells, eosinophils, NK cells	Anti-inflammatory; TH2 differentiation; adhesion; chemotaxis
IL-6	T cells, macrophages, endothelial cells	Proinflammatory; pleiotropic; pyrogenic function; acute phase response; lymphoid differentiation; increased antibody production,
IL-9	TH9 cells	Pleiotropic; stimulation of B, T, and NK cells; protection from helminth infections; activation of mast cells; association with type I interferon in COVID-19
IL-10	regulatory T cells, TH9 cells	Anti-inflammatory; inhibition of macrophage activation; inhibition of TH1 cells and cytokine release

Mediator	Main Source	Major Function
IL-12	dendritic cells, macrophages	Stimulation of T and NK cells; activation of TH1 pathway; induction of interferon- γ from TH1 cells; cytotoxic T cells and NK cells; acting in synergy with interleukin-18
IL-13	TH2 cells	Anti-inflammatory; differentiation of B cells; mediator of humoral immunity
IL-17	TH17 cells, NK cells, group 3 innate lymphoid cells	Protection from bacterial and fungal infections; promotion of neutrophilic inflammation
IL-18	monocytes, macrophages, dendritic cells	Proinflammatory; activation of TH1 pathway; synergistic with interleukin-12
IL-31	TH2 cells, macrophages, mast cells, dendritic cells	Proinflammatory; cell-mediated immunity
IL-33	macrophages, dendritic cells, mast cells, epithelial cells	Proinflammatory; amplification of TH1 and TH2 cells; activation of cytotoxic T cells, NK cells, and mast cells
Type I Interferon	virtually all body cells	Dendritic cell. activation/maturation/migration/survival; enhancement of the activity of NK and T/B cells; induction of antiviral effector molecules; antagonism to the action of interferon- γ
Interferon- γ (Type II IFN)	TH1 cells, cytotoxic T cells, group 1 innate lymphoid cells, NK cells	Proinflammatory; activation of monocytes and macrophages
Lymphotoxin α	activated lymphocytes	Pleiotropic; activation of NF- κ B pathway
TGF- β	Treg cells, monocytes, macrophages, fibroblasts, epithelial cells, cancer cells	Immunosuppressive; regulation of proliferation, differentiation, apoptosis, and adhesion; inhibition of hematopoiesis
Tumor necrosis factor	T cells, NK cells, mast cells, macrophages	Pyrogenic; increasing vascular permeability

Ці медіатори є частиною еволюційно добре збереженої вродженої імунної відповіді, яка необхідна для ефективної елімінації інфекційних агентів і

процесів відновлення, які слідує за цим [6]. Легка вторинна дисфункція органів під час запальної реакції є еволюційно прийнятною, якщо вона дозволяє господарю подолати інфекцію та вижити. Якщо запальна реакція викликає надмірну дисфункцію органу, що ставить під загрозу виживання та репродуктивну здатність господаря (за відсутності вентиляційної підтримки та діалізу), то це є патологією.

Існують великі регуляторні механізми, які модулюють імунну відповідь і запобігають цитокіновому шторму [11].

1.4. Роль інтерлейкінів в організмі

Основні сучасні уявлення про інтерлейкіни гарно узагальнені і представлені у роботі Justiz Vaillant AA, Qurie A. (2022) [21]: «1. Вироблення інтерлейкінів є самообмеженим процесом. Матрична РНК, що кодує більшість інтерлейкінів, є нестабільною і викликає тимчасовий синтез. Після синтезу ці молекули швидко виділяються.

2. Клітинні відповіді на інтерлейкіни включають механізми висхідної та зниженої регуляції з індукцією та участю генів, які кодують інгібітори цитокінових рецепторів.

3. Інтерлейкіни мають надлишкові функції. Наприклад, IL-4, IL-5 та IL-13 є факторами росту В-клітин і стимулюють диференціацію В-клітин.

4. Цитокіни стимулюють перемикання ізотипів антитіл у В-клітинах, диференціацію хелперних Т-клітин на субгрупи Th-1 і Th-2 і активацію мікробіцидних механізмів у фагоцитах.

5. Інтерлейкіни часто впливають на синтез і дії інших інтерлейкінів. Наприклад, IL-1 сприяє активації лімфоцитів, що призводить до вивільнення IL-2.

6. Клітинні реакції на цитокіни стимулюються та регулюються зовнішніми сигналами або високоафінними рецепторами. Наприклад, стимуляція В-клітин патогенами призводить до посилення експресії цитокінових рецепторів.

7. Більшість цитокінів діють або на ту саму клітину, яка секретує цитокін,

наприклад, IL-2, що виробляється Т-клітинами, діє на ті самі Т-клітини, які його створили, або на сусідню клітину. Крім того, цитокіни можуть потрапляти в кровообіг і діяти далеко від місця синтезу, наприклад, IL-1 є ендогенним пірогеном, який діє на центральну нервову систему (ЦНС) і викликає лихоманку.

8. Невеликі кількості цитокіну необхідні, щоб зайняти рецептори та викликати біологічні ефекти» [1, 21].

Зараз ми визначаємо десь 38 різних лімфокінів, які синтезуються клітинами імунної системи та діють на них. Їм надано послідовні номери, наприклад IL-1, IL-2, IL-3 тощо, і вони відрізняються за активністю та клітиною-мішенню, на яку вони впливають. Найкраще вивченими та відкритими першими є інтерлейкіни, представлені у таблиці 1.5.

IL-1 чинить вплив на кровоносні судини, а саме змушує клітини вистилки кровоносних судин (ендотелій) експресувати нові білки на їх поверхні, які розпізнаються циркулюючими імунними клітинами. Потім активовані фагоцити та лімфоцити можуть прикріплюватися, проникати в судину та локалізуватися в тканинах. Це явище називається хемотаксисом і дозволяє клітинам, відповідальним за імунітет і запалення, мігрувати саме в ті місця, де в організм проникли чужорідні агенти. Проникнення лімфоцитів у кровоносну судину відбувається без руйнування стінки судини, оскільки клітини фактично протискаються між сусідніми ендотеліальними клітинами. Потрапляючи в тканини, запальні клітини активно мігрують до бактерій, слідуючи зростаючому градієнту концентрацій хемотаксинів [14].

Хемотаксини - це речовини, що виробляються макрофагами, які є першими клітинами, що контактують з бактеріями, і активованими компонентами системи комплементу. IL-1 і TNF також активують лімфоцити для експресії нових цитокінових рецепторів і секреції цитокінів, необхідних для їх майбутнього розвитку. Крім того, відомо, що вони змушують клітини експресувати антигени гістосумісності, необхідні для належної міжклітинної взаємодії та розрізнення між собою та не-собою [2, 40].

Узагальнення відомостей про основні інтерлейкіни та їх функції [40]

Interleukin (cytokine)	Source	Target cell	Effect
IL-1	Macrophage, lymphocytes, endothelium, fibroblasts, astrocytes	T-cells, B-cells, macrophage, endothelium, tissue cells	Lymphocyte activation, leukocyte-endothelial adhesion, fever, regulates sleep
IL-2	T-cells	T-cells	T-cell growth factor
IL-3	T-cells	Bone marrow cells	Stimulates bone marrow growth
IL-4	T-cells	B- and T-cells	B-cell growth factor
IL-5	T-cells	B-cells	B-cell growth factor
IL-6	T- and B-cells, macrophages, fibroblasts	B-cells and hepatocytes	B-cell differentiation and synthesis of acute phase reactants
IL-7	Lymphocytes	B- and T-cells	Stimulates proliferation of immature cells
IL-8	T-cells, macrophages	Granulocytes, endothelium	Stimulates the activity of neutrophils, acts as chemotaxin, inhibitor of endothelial cell-leukocyte adhesion
IL-9	T-cells	T-cell	T-cell and mast cell growth enhancement
IL-10	T-cells	Macrophage	Suppresses the development of T-cell subpopulations (TH1) by inhibition of macrophage IL-12 production
IL-11	Bone marrow stromal cells	Hepatocyte	Induces synthesis of acute phase proteins
IL-12	Macrophage	T-cells	Enhances the B-cells expression of IFN- γ during T-cell activation; also stimulates a lymphocyte subpopulation (NK cells)

Цитокіни типу ІЛ (інтерлейкін)-6, ІЛ-6, ІЛ-11, LIF (фактор інгібітору лейкемії), OSM (онкостатин М), циліарний нейротрофічний фактор, кардіотрофін-1 і кардіотропіноподібний цитокін є важливою групою

медіаторів, що беруть участь у регуляції гострофазової реакції на травму та інфекцію. Окрім своїх функцій у запаленні та імунній відповіді, ці цитокіни також відіграють вирішальну роль у кровотворенні, печінці та регенерації нейронів, ембріональному розвитку та фертильності. Порушення регуляції передачі сигналів цитокінів типу IL-6 сприяє виникненню та підтримці кількох захворювань, таких як ревматоїдний артрит, запальне захворювання кишечника, остеопороз, розсіяний склероз і різні типи раку (наприклад, множинна мієлома та рак простати). Цитокіни типу IL-6 здійснюють свою дію через перетворювачі сигналу gp (глікопротеїн) 130, рецептор LIF і рецептор OSM, що призводить до активації JAK/STAT (Янус-кіназа/сигнальний перетворювач і активатор транскрипції) і MAPK (активований мітогеном) протеїнкіназа) каскадів [9, 14].

Зараз іде активне дослідження молекулярних механізмів передачі сигналу цитокінів типу IL-6. Акцент робиться на припиненні та модуляції сигнального шляху JAK/STAT, опосередкованого тирозинфосфатазами, інгібіторами зворотного зв'язку SOCS (супресор передачі сигналів цитокінів) і білками PIAS (білковий інгібітор активованого STAT). Також обговорюється взаємозв'язок між шляхом JAK/STAT та іншими сигнальними каскадами [14].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Організація експериментального дослідження

Для проведення даного дослідження було сформовано експериментальні групи з білих безпородних самців-мишей. Для забезпечення об'єктивності дослідження всі тварини утримувалися в ідентичних умовах віварію: температура повітря становила 20 °С, режим харчування та пиття був стандартизований. Дослідження тривало шість тижнів, мало декілька етапів і проводилося відповідно до міжнародних стандартів біоетики. Протягом цього періоду тваринам проводили ряд експериментальних процедур, які були детально описані в протоколі дослідження.

Експериментальні тварини були розподілені на шість груп:

1. Перша дослідна група: миші, які отримували інгібітор ІЛ-2 (0,4 мл перорально в концентрації 10 мг/кг).
2. Друга дослідна група: миші, які отримували ІЛ- 2 (0,2 мл у концентрації 5000 МО/кг).
3. Третя дослідна група: миші, які отримували ІЛ- 2 (0,2 мл у концентрації 7500 МО/кг).
4. Четверта дослідна група: миші, які отримували ІЛ- 2 (0,2 мл у концентрації 30000 МО/кг).
5. П'ята дослідна група: миші, які за схемою нашого експерименту отримували фізіологічний розчин в такому ж об'ємі, як і дослідна речовина.

Для оцінки фізичної витривалості тварин усіх експериментальних груп щодня проводили тест на примусове плавання. Тварин змушували плавати з додатковим вантажем, що становив 7,5 % від їхньої маси тіла, до повного виснаження. Цей тест, який залучає як аеробні, так і анаеробні процеси, дозволяв оцінити загальну фізичну працездатність тварин [39].

Перед початком основного експерименту протягом тижня проводилося попереднє тестування на плавання з метою визначення індивідуальних

показників витривалості кожної тварини. Далі, експериментальне дослідження було розбите на кілька періодів: контроль(перший день тренувань), другий, четвертий та шостий тижні. Показники плавання в перший день тренувань були взяті за вихідні для порівняння з результатами, отриманими на шостому тижні, з метою оцінки довготривалих ефектів експериментальних втручань.

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення Statistica 6.0. Для оцінки достовірності відмінностей використовували непараметричний критерій Манна-Уїтні, вибравши рівень значущості 0,05.

2.2. Методи експериментального дослідження

Дослідження пофарбованих мазків крові. Для морфологічного дослідження крові готують мазки, які фіксують та фарбують за методом Романовського-Гімзи. Далі, препарати досліджують під мікроскопом з імерсійною системою (об'єктив $\times 90$), використовуючи імерсійне масло. Після завершення роботи імерсійне масло видаляють із мазка сухою ваткою. Під час мікроскопії оцінюють розміри, форму, забарвлення клітин крові та їхніх структурних компонентів (ядро, цитоплазма, включення), а також визначають кількісні співвідношення між різними форменими елементами крові.

Розрахунок лейкограми проводили за стандартними методиками [62, 63].

Дослідження цитохімічних показників дослідної крові.

З метою оцінки ефекторних механізмів аутоімунних захворювань на рівні клітин, ми провели цитохімічне дослідження гранулоцитів периферичної крові. Зокрема, визначали активність мієлопероксидази, вміст катіонних білків та лужної фосфатази, а також аналізували ліпідний склад клітинних мембран. Для кількісної оцінки інтенсивності цитохімічних реакцій використовували модифікацію методу Astaldi [62, 64].

З метою оцінки активності лужної фосфатази в досліджуваних зразках було використано цитохімічний метод азосполучення за Kerploу. Цей метод

дозволяє візуалізувати ферментативну активність лужної фосфатази шляхом утворення нерозчинних азобарвників [65].

Дослідження кислої фосфатази дослідної крові.

З метою отримання мазка крові для мікроскопічного дослідження, краплю крові наносять на край сухого знежиреного предметного скла. Далі, шляхом розтягування, формують тонкий рівномірний мазок. Після висушування на повітрі, мазок фіксують у парах формаліну для збереження морфологічних характеристик клітин [65].

Для оцінки мієлопероксидазної активності гранулоцитів використовували методику Graham, Knoll [65], засновану на перетворенні бензидину на оксибензидин внаслідок окиснення пероксидазою.

Для оцінки поведінки застосовували **метод «Відкрите поле»**. Спостереження за тваринами здійснювали візуально та фіксували на відео для подальшого аналізу в програмі RealTime. Кожна тварина перебувала в «відкритому полі» протягом 5 хвилин. Після розміщення в центрі арени фіксували час до початку руху, кількість перетинань периферійних та центральних зон, кількість піднімань на стінки з опорою та без опори, частоту вмивань, кількість фекалій та сечовиділень, що відображає рівень емоційної реактивності та тривожності. Після кожного тестування арена ретельно очищалася.

Також було проведено **тест Порсольтя** (примусового плавання). Тварин поміщали у скляні циліндри, заповнені водою температурою 25°C до рівня 20 см. Фіксували тривалість та частоту активного плавання, пасивного дрейфу та стану повної нерухомості протягом 5 хвилин. Нерухомість визначали як відсутність будь-яких рухів, крім ледь помітних рухів задніми кінцівками для підтримки голови над водою. Дрейф характеризувався слабкими, вимушеними рухами задніх лап [39].

РОЗДІЛ 3

АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

3.1. Показники крові експериментальних тварин

3.1.1. Стан лейкограми досліджуваних тварин, Лейкограма є відображенням загального функціонального стану організму та, зокрема, імунної системи. Ми провели дослідження показників лейкограми у мишей контрольної групи на різних етапах експерименту. Варто зазначити, що тварини контрольної групи не були повністю інтактними, оскільки піддавались фізичним навантаженням, але замість інтерлейкіну отримували фізіологічний розчин. Отримані результати щодо співвідношення різних типів лейкоцитів (базофілів, еозинофілів, нейтрофілів, лімфоцитів та моноцитів) у першій і третій групах (що відповідають першому та третьому етапам експерименту) відповідають нормативним показникам (рис. 3.1).

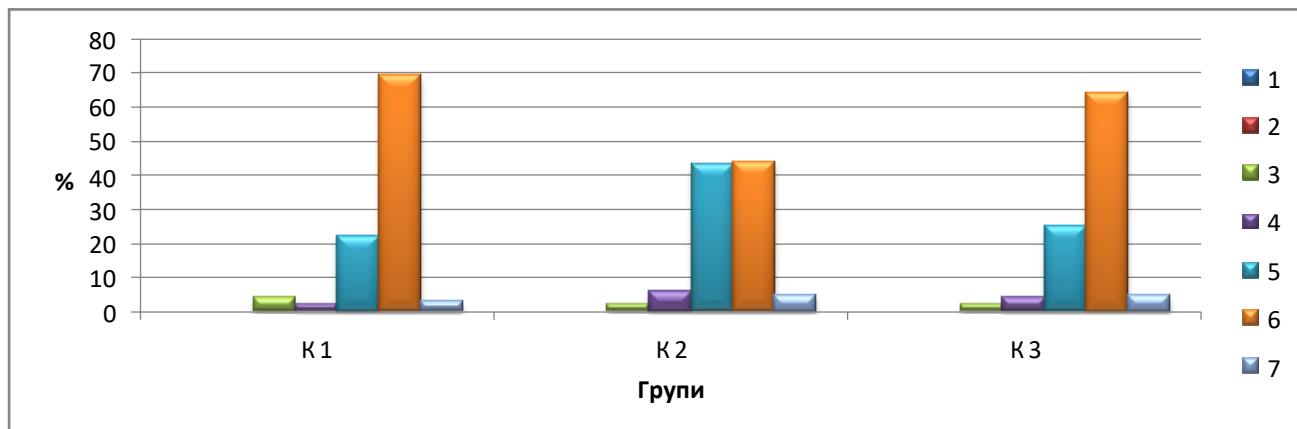


Рис. 3.1. Динаміка відсоткового співвідношення різних типів лейкоцитів у крові мишей контрольної групи протягом експерименту

Примітка: зміни у вмісті базофілів (1), еозинофілів (2), юних (3), паличкоядерних (4) та сегментоядерних нейтрофілів (5), лімфоцитів (6) та моноцитів (7) на різних етапах дослідження.

На четвертому тижні фізичних тренувань ми помітили деякі зміни у лейкограмі мишей контрольної групи (K2). Зокрема, кількість базофілів, юних нейтрофілів, еозинофілів та моноцитів залишалась у межах норми. Проте, вміст

сегментоядерних й паличкоядерних нейтрофілів перевищував норму на 20%, а кількість лімфоцитів була нижчою за нормативні показники на 16%. Таким чином, фізичні навантаження спричинили певну реакцію імунної системи, яка виявилась у збільшенні кількості фагоцитів та зниженні рівня лімфоцитів.

Для подальшого аналізу ми провели розрахунок лейкограми у мишей експериментальних груп наприкінці другого, четвертого та шостого тижнів експерименту (рис. 3.2, 3.3, 3.4).

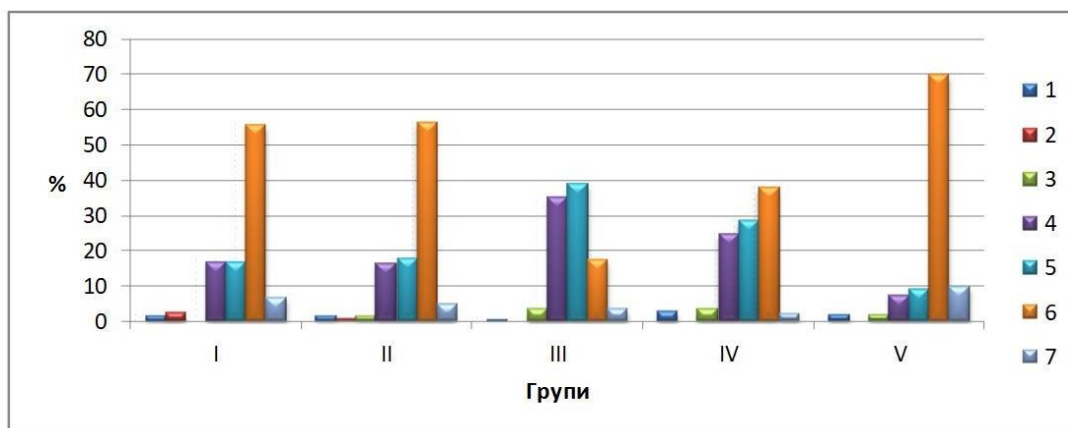


Рис. 3.2. Динаміка відсоткового співвідношення різних типів лейкоцитів у крові мишей експериментальних груп на 2-му тижні, %

Примітка: зміни у вмісті базофілів (1), еозинофілів (2), юних (3), паличкоядерних (4) та сегментоядерних нейтрофілів (5), лімфоцитів (6) та моноцитів (7) на різних етапах дослідження.

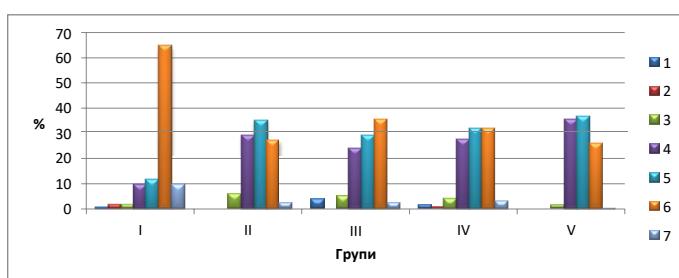


Рис. 3.3. Динаміка відсоткового співвідношення різних типів лейкоцитів у крові мишей експериментальних груп на 4-му тижні, %

Примітка: зміни у вмісті базофілів (1), еозинофілів (2), юних (3), паличкоядерних (4) та сегментоядерних нейтрофілів (5), лімфоцитів (6) та моноцитів (7) на різних етапах дослідження.

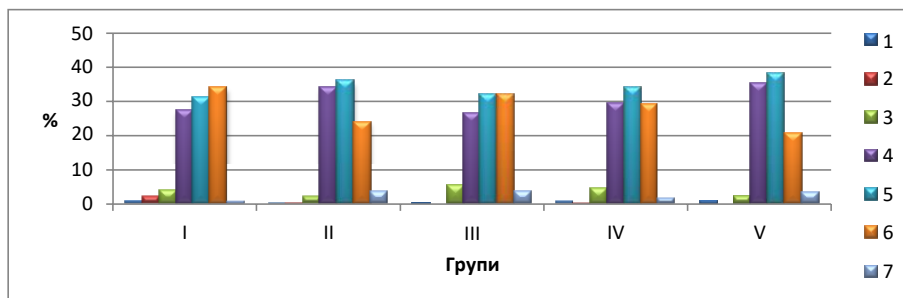


Рис. 3.4. Динаміка відсоткового співвідношення різних типів лейкоцитів у крові мишей експериментальних груп на 6-му тижні, %

Примітка: зміни у вмісті базофілів (1), еозинофілів (2), юних (3), паличкоядерних (4) та сегментоядерних нейтрофілів (5), лімфоцитів (6) та моноцитів (7) на різних етапах дослідження.

Ми відстежували зміни лейкограми в кожній групі за періодами (рис. 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9).

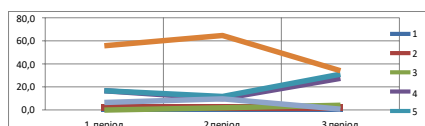


Рис. 3.5. Аналіз змін лейкограми в першій групі мишей, %

Примітка: зміни у вмісті базофілів (1), еозинофілів (2), юних (3), паличкоядерних (4) та сегментоядерних нейтрофілів (5), лімфоцитів (6) та моноцитів (7) на різних етапах дослідження

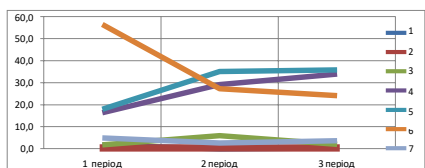


Рис. 3.6. Аналіз змін лейкограми в другій групі мишей, %

Примітка: зміни у вмісті базофілів (1), еозинофілів (2), юних (3), паличкоядерних (4) та сегментоядерних нейтрофілів (5), лімфоцитів (6) та моноцитів (7) на різних етапах дослідження

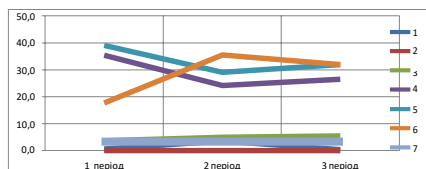


Рис. 3.7. Аналіз змін лейкограми в третій групі мишей, %

Примітка: зміни у вмісті базофілів (1), еозинофілів (2), юних (3), паличкоядерних (4) та сегментоядерних нейтрофілів (5), лімфоцитів (6) та моноцитів (7) на різних етапах дослідження

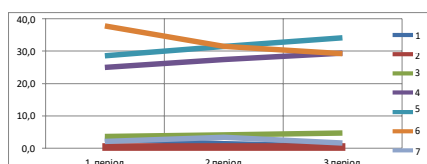


Рис. 3.8. Аналіз змін лейкограми в четвертій групі мишей, %

Примітка: зміни у вмісті базофілів (1), еозинофілів (2), юних (3), паличкоядерних (4) та сегментоядерних нейтрофілів (5), лімфоцитів (6) та моноцитів (7) на різних етапах дослідження.

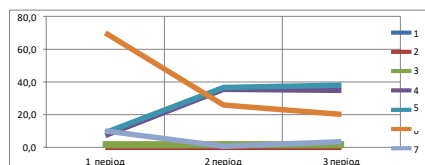


Рис. 3.9. Аналіз змін лейкограми в п'ятій групі мишей, %

Примітка: зміни у вмісті базофілів (1), еозинофілів (2), юних (3), паличкоядерних (4) та сегментоядерних нейтрофілів (5), лімфоцитів (6) та моноцитів (7) на різних етапах дослідження.

3.1.2. Дослідження цитохімічних показників крові. Для подальшого дослідження було проведено попереднє якісне дослідження активності основних ферментів у препаратах крові експериментальних тварин. Застосування цитохімічного методу та розрахунку середнього цитохімічного коефіцієнта дозволило оцінити загальний вплив інтерлейкіну-2 на біохімічні показники клітин периферичної крові мишей (рис. 3.10).

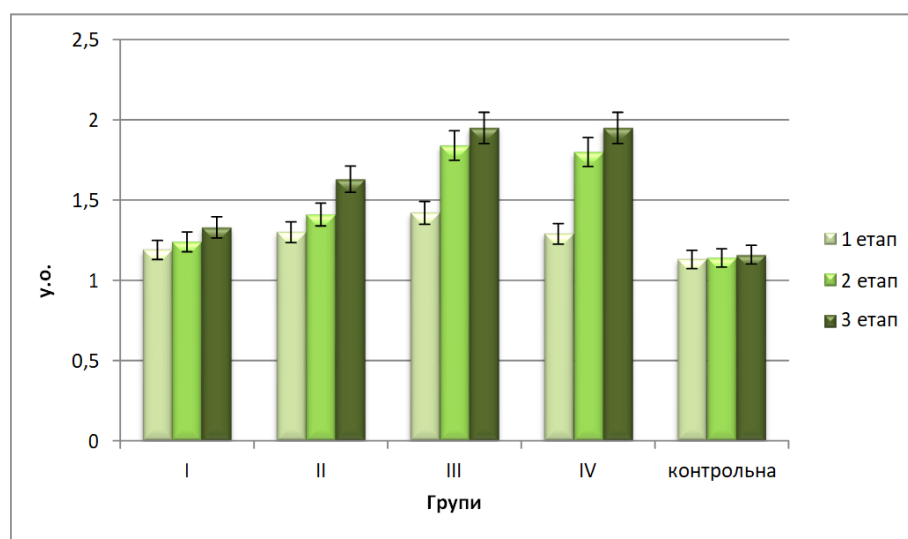


Рис. 3.10. Порівняльний аналіз вмісту мієлопероксидази у різних експериментальних групах на різних етапах дослідження, ум. од.

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

Ми виявили, що рівень мієлопероксидази був суттєво вищим у експериментальних групах мишей порівняно з контрольною. При цьому, у тварин, які зазнавали лише фізичних навантажень, активність мієлопероксидази залишалася сталою протягом усього дослідження. Хоча в групі, що отримувала циклоспорин (інгібітор інтерлейкіну-2), спостерігалось певне зростання цього ферменту, статистично достовірних відмінностей не було виявлено. Найбільш виражені зміни вмісту мієлопероксидази були зафіксовані в групах, де тваринам вводили інтерлейкін-2 в різних концентраціях (це II- IV групи дослідних тварин).

Ми спостерігали поступове підвищення активності мієлопероксидази в усіх експериментальних групах протягом дослідження. Найбільш виражене зростання було зафіксовано у тварин, які отримували середні та високі дози

інтерлейкіну-2. Статистичний аналіз показав, що найбільш значущі зміни відбувалися між першим та другим етапами експерименту, тоді як на третьому етапі темпи зростання сповільнилися.

Для детального аналізу динаміки змін активності мієлопероксидази ми представили графіки для кожного етапу дослідження окремо (рис. 3.11-3.13). Аналіз початкового етапу (див. рис. 3.11) показав, що найвищий рівень мієлопероксидази спостерігався в третій групі, тоді як найнижчий - в першій групі та у контрольній.

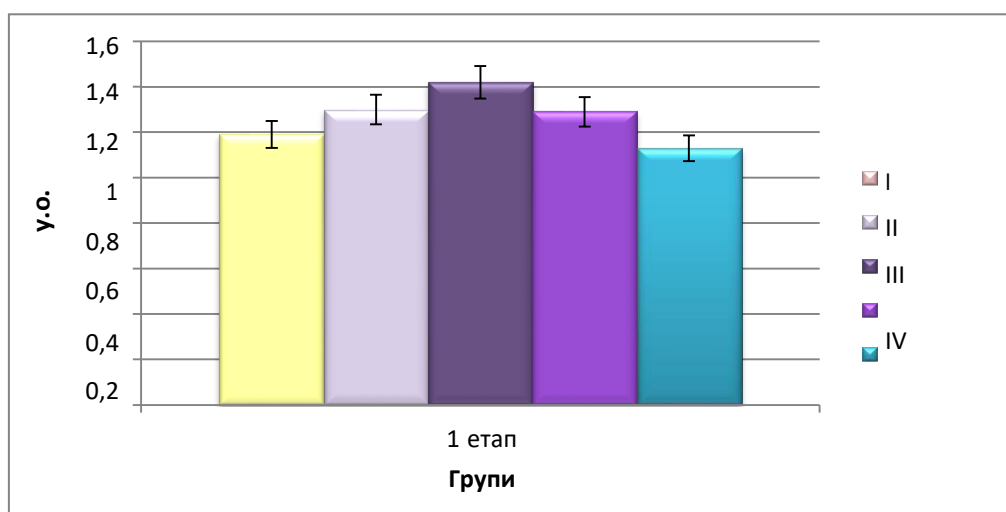


Рис. 3.11. Порівняльний аналіз вмісту мієлопероксидази у різних експериментальних групах на 1-му етапі експерименту, ум. од.

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

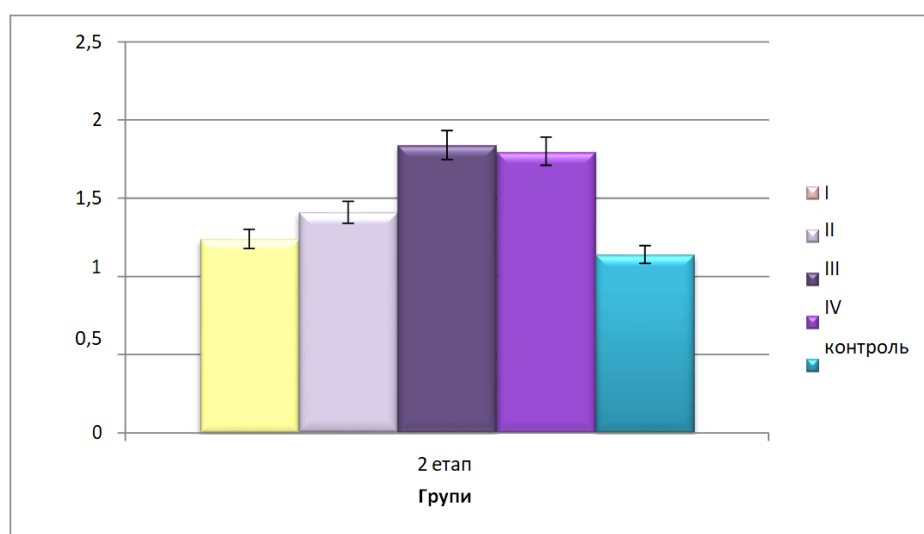


Рис. 3.12. Порівняльний аналіз вмісту мієлопероксидази у різних експериментальних групах на 2-му етапі експерименту, ум. од.

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

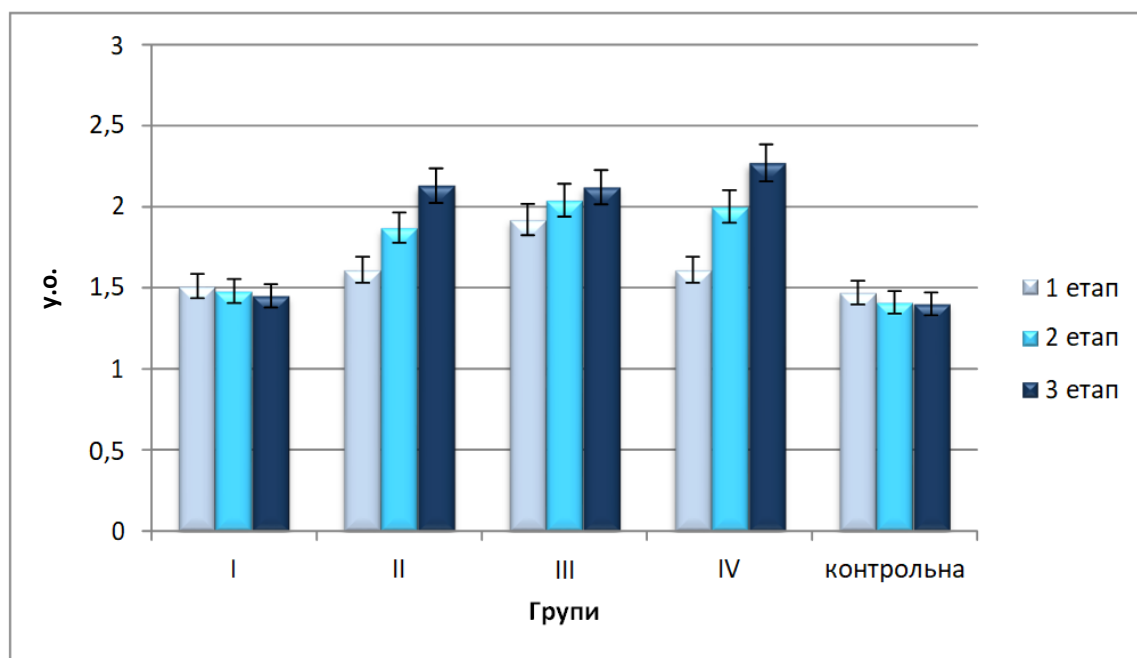


Рис. 3.13. Порівняльний аналіз вмісту мієлопероксидази у різних експериментальних групах на 3-му етапі експерименту, ум. од.

На другому етапі дослідження характер розподілу мієлопероксидазної активності дещо змінився порівняно з першим. Проте, загальна тенденція збереглася: найнижчий рівень ферменту спостерігався у контрольній групі. Водночас, у першій та другій експериментальних групах спостерігалася незначне підвищення активності мієлопероксидази, а найбільш вираженим воно було в третій та четвертій групах.

Аналіз даних, отриманих на третьому етапі дослідження, показав, що дозозалежний характер впливу інтерлейкіну-2 на активність мієлопероксидази зберігається. Незважаючи на незначну варіабельність показників між другим та третім етапами, загальна тенденція до посилення окисного стресу внаслідок активації нейтрофілів під впливом інтерлейкіну-2 залишилася незмінною.

Лужна фосфатаза, як фермент, що відіграє ключову роль у дефосфорилюванні широкого спектру біологічно активних молекул, таких як нуклеотиди, білки та алкалоїди, була обрана нами для дослідження. З метою оцінки її ролі в процесах, що відбуваються в організмі досліджуваних тварин, ми провели визначення активності цього ферменту в клітинах периферичної крові експериментальних тварин (рис. 3.14).

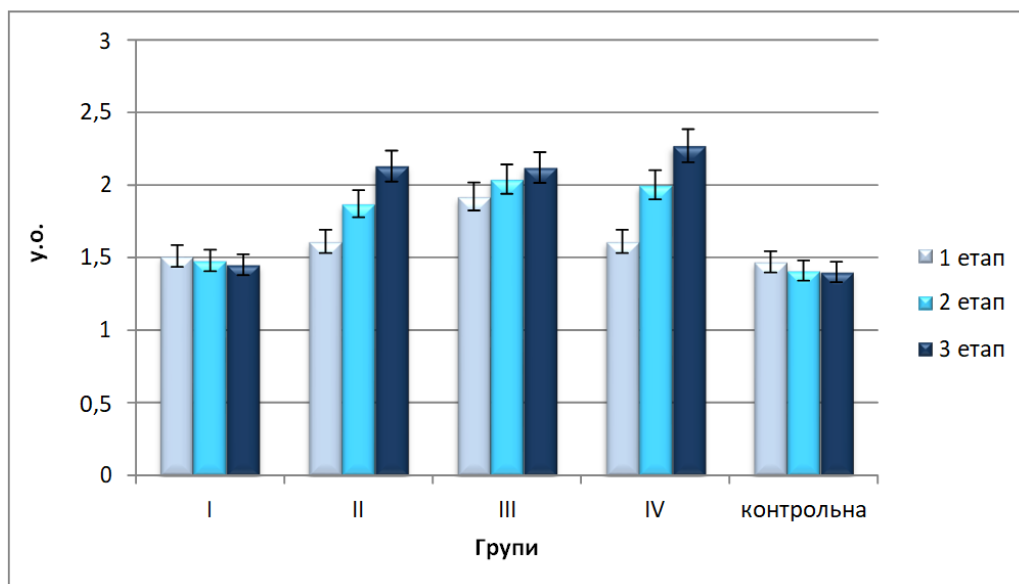


Рис. 3.14. Порівняльний аналіз вмісту лужної фосфатази у різних експериментальних групах на різних етапах дослідження, ум. од.

Ми з'ясували, що у контрольній групі середній цитохімічний коефіцієнт лужної фосфатази

протягом всього експерименту залишався стабільним і становив 1,47-1,4 у.о., що відповідає нормі. Аналогічна картина спостерігалася і в першій експериментальній групі, де показники активності ферменту також не зазнали суттєвих змін протягом всіх етапів дослідження.

Аналіз отриманих нами даних під час експерименту дозволяє зробити висновок про наявність кореляції між концентрацією інтерлейкіну-2 та активністю лужної фосфатази. Максимальне підвищення активності ферменту було зафіксовано у тварин третьої експериментальної групи, що отримували середню терапевтичну дозу інтерлейкіну-2.

Статистичний аналіз даних, отриманих на першому етапі дослідження, показав, що середні значення активності лужної фосфатази в більшості експериментальних груп не мали статистично значимих відмінностей від контрольних значень (рис. 3.15).

Виняток становила третя група, де спостерігалось достовірне підвищення активності ферменту. Тільки тварини групи, що отримувала інтерлейкін у концентрації 7500 МО/кг, показала різке підвищення цього ферменту.

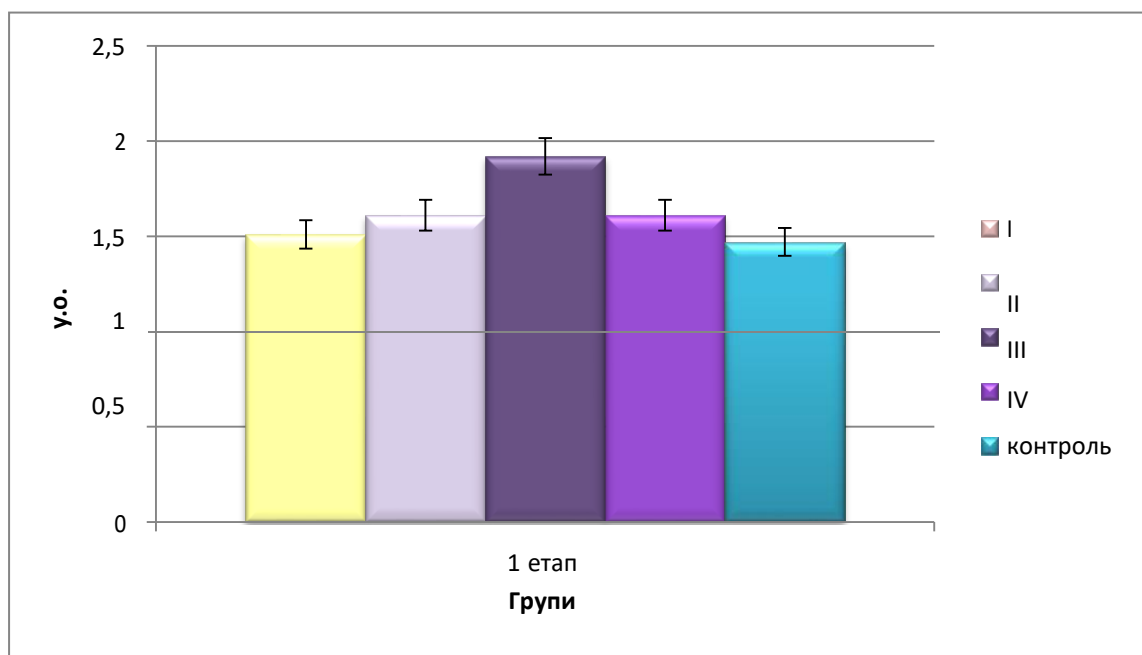


Рис. 3.15. Порівняльний аналіз вмісту лужної фосфатази у різних експериментальних групах на 1-му етапі дослідження, ум. од.

На другому етапі експерименту (рис. 3.16) розподілення було уже не таким.

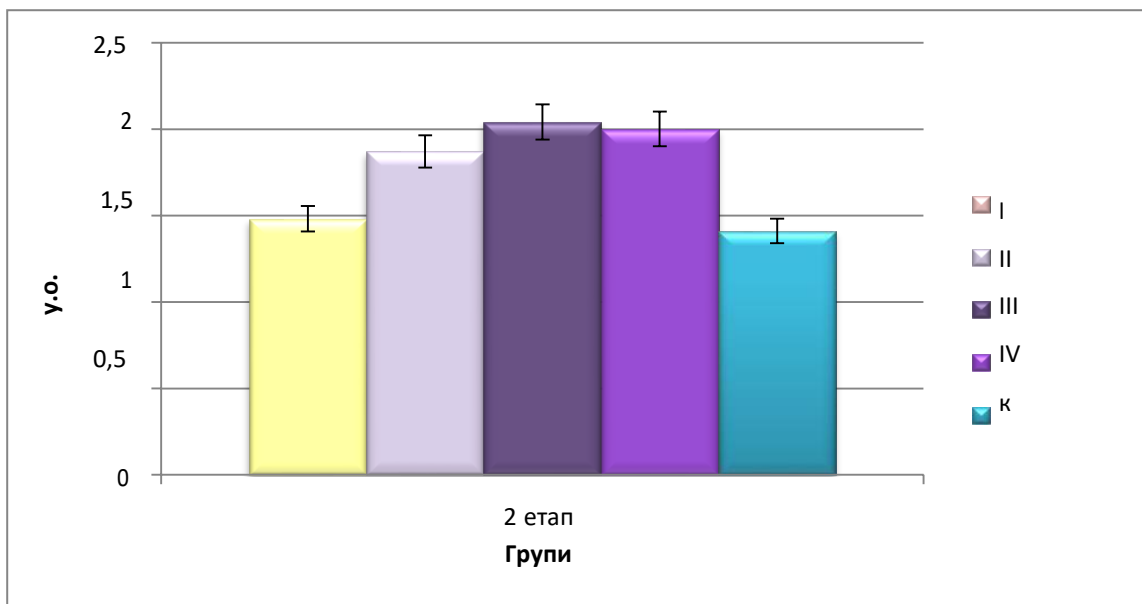


Рис. 3.16. Порівняльний аналіз вмісту лужної фосфатази у різних експериментальних групах на 2-му етапі дослідження, ум. од.

Статистичний аналіз показав, що застосування циклоспорину не призвело до достовірних змін активності лужної фосфатази порівняно з контрольною

групою. Водночас, введення інтерлейкіну-2 супроводжувалося статистично значущим підвищенням рівня цього ферменту, що свідчить про прямий вплив інтерлейкіну-2 на активність лужної фосфатази.

На третьому етапі були наступні зміни зафіксовані (рис. 3.17). Статистичний аналіз даних показав, що на початкових етапах дослідження не було виявлено достовірних відмінностей між контрольною та першою експериментальною групами. Однак, введення інтерлейкіну-2 призвело до дозозалежного підвищення активності лужної фосфатази в лейкоцитах периферичної крові, що свідчить про стимулюючий ефект цього цитокіну на синтез та накопичення ферменту.

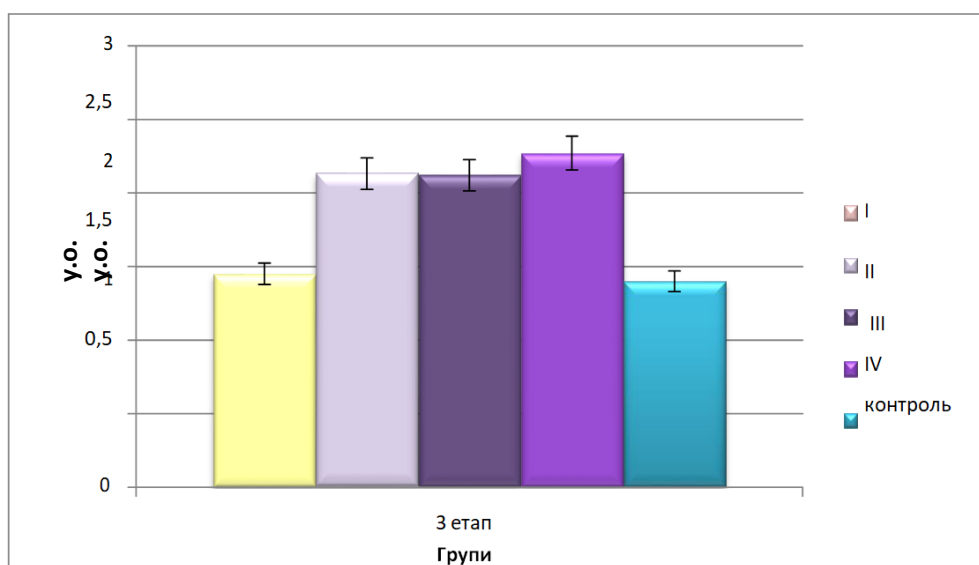


Рис. 3.17. Порівняльний аналіз вмісту лужної фосфатази у різних експериментальних групах на 3-му етапі дослідження, ум. од.

З метою отримання більш детальної інформації про ферментативну активність лейкоцитів периферичної крові під впливом інтерлейкіну-2, ми провели додаткове дослідження, спрямоване на визначення вмісту кислої фосфатази. Результати цього дослідження представлені на рисунку 3.18.

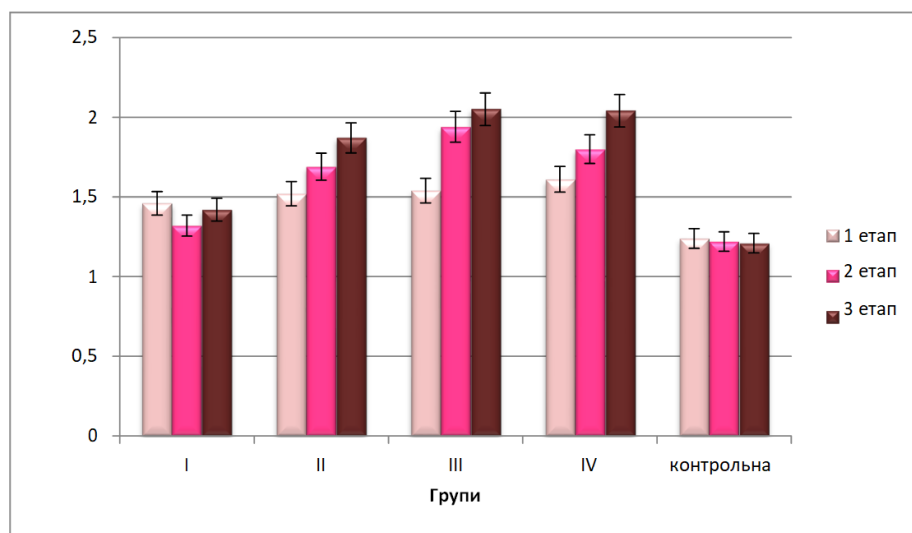


Рис. 3.18. Порівняльний аналіз вмісту кислої фосфатази у різних експериментальних групах на різних етапах дослідження, ум. од.

Проаналізувавши отримані дані ми з'ясували, що рівень кислої фосфатази в першій експериментальній групі був статистично вищим за контрольну, проте значно нижчим за групи, які отримували інтерлейкін-2. На початкових етапах дослідження зростання активності ферменту було незначним, однак згодом спостерігалось стрімке підвищення рівня кислої фосфатази у II-IV експериментальних групах.

На рис. 3.19 видно, що на початковому етапі експерименту (2 тиждень) вміст кислої фосфатази підвищився порівняно із контрольними значеннями в усіх дослідних групах.

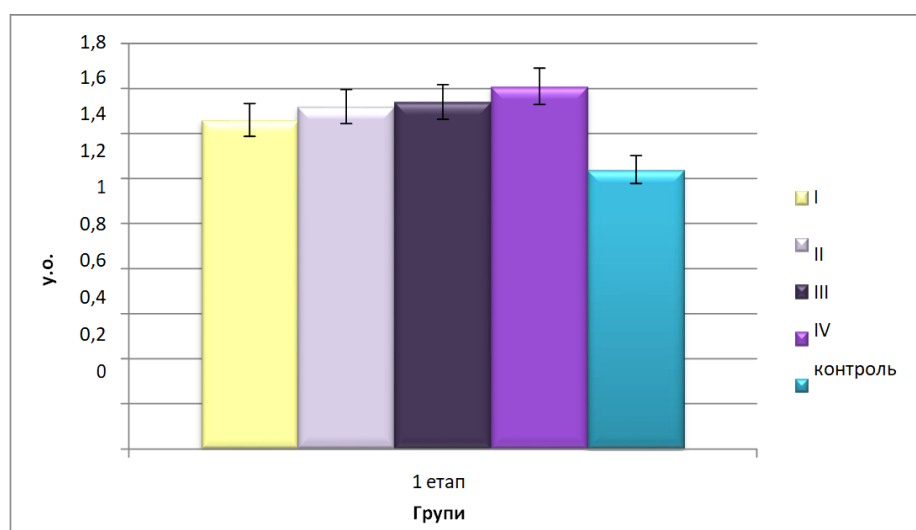


Рис. 3.19. Порівняльний аналіз вмісту кислої фосфатази у різних експериментальних групах на 1-му етапі дослідження, ум. од.

Дані свідчать про наявність тенденції до підвищення показників зі зростанням дози, однак статистичний аналіз не дозволив підтвердити цю залежність на високому рівні значущості. На другому етапі видно, що вміст кислої фосфатази стрімко підвищується, порівнюючи із контрольними показниками та 1-ю групою дослідних тварин (рис. 3.20).

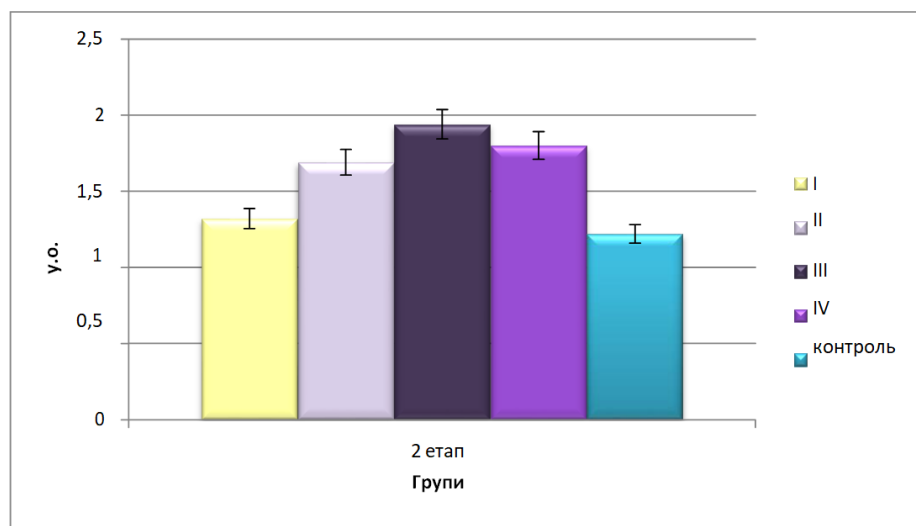


Рис. 3.20. Порівняльний аналіз вмісту кислої фосфатази у різних експериментальних групах на 2-му етапі дослідження, ум. од.

На рисунку 3.21 ми бачимо, що до в г о тривале введення препарату інтерлейкіну стає активатором для підвищення активності вмісту лужної фосфатази.

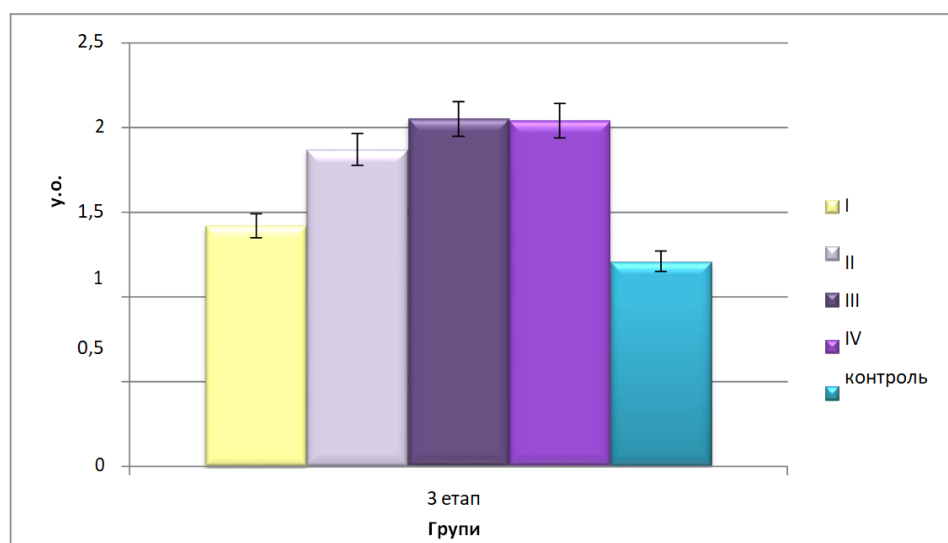


Рис. 3.21. Порівняльний аналіз вмісту кислої фосфатази у різних експериментальних групах на 3-му етапі дослідження, ум. од.

Найбільш виражене підвищення вмісту ферменту спостерігалось у групах тварин, які отримували середні та високі дози інтерлейкіну-2, що свідчить про дозозалежний характер цієї дії.

3.2 Дослідження поведінки дослідних тварин за методикою «відкрите поле»

Для оцінки поведінки тварин у тесті «відкрите поле» використовували такі показники: час руху по периметру поля, час перебування в центрі, кількість піднімань на задні лапи, час нерухомості, час догляду за шерстю та частоту дефекації. Ці показники дозволяють оцінити рівень тривожності, допитливості та емоційну реактивність тварин. Ми провели експеримент, спрямований на дослідження впливу різних доз рекомбінантного інтерлейкіну-2 та його інгібітора, циклоспорину, на різноманітні функції центральної нервової системи мишей. Оцінку досліджуваних параметрів проводили на першому, четвертому та шостому тижнях експерименту.

Як видно з рисунка 3.22, показники рухової активності мишей (час перебування на периферії та в центрі поля, кількість вертикальних стійок) зазнавали динамічних змін протягом усіх періодів експерименту, відрізняючись між різними дослідними групами. Рисунок 3.22 демонструє, що рухова активність мишей та їхня схильність до дослідження середовища зазнавали суттєвих змін протягом експерименту. Спостерігалися як періоди підвищення, так і зниження цих показників.

Дослідження рухової активності мишей I групи продемонструвало, що блокування ІЛ-2 призвело до достовірного зниження дослідницької поведінки та рухової активності в центральній зоні поля, особливо в середині та наприкінці експерименту. Однак, мінімальна рухова активність на периферії була зафіксована лише на початку дослідження.

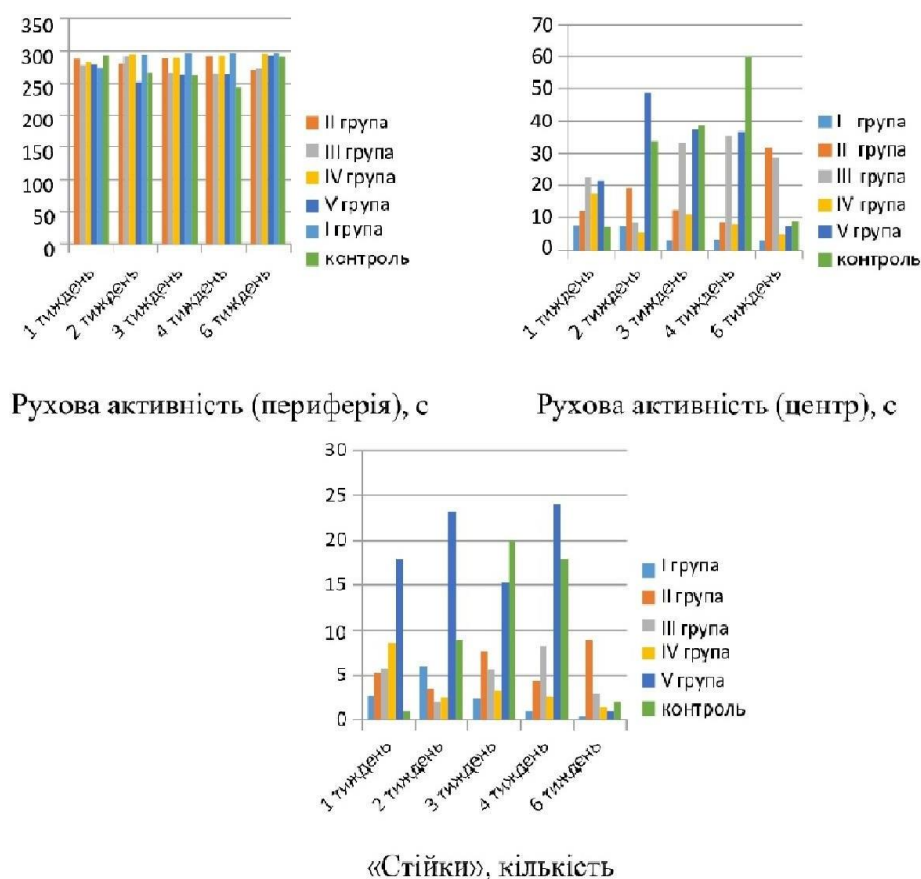


Рис. 3.22. Динаміка поведінкових показників у тесті «Відкрите поле» (рухова активність та стійки)

Миші II групи, які отримували малу дозу ІЛ-2, демонстрували стабільну рухову активність на периферії протягом усього дослідження. Проте, на шостому тижні було зафіксовано значне підвищення рухової активності в центральній зоні поля та кількості горизонтальних стійок, що, ймовірно, пов'язано з адаптацією тварин до хронічного введення препарату.

Порівнюючи групи тварин, які отримували середню та високу дози ІЛ-2, було встановлено, що тварини з найбільшою дозою (30000 МО/кг) демонстрували вищу рухову активність на периферії протягом усього експерименту. Однак, рухова активність у центральній зоні поля була значно вищою у тварин, які отримували середню дозу (7500 МО/кг). Кількість вертикальних стійок була найбільшою лише на першому тижні у тварин з високою дозою, що може свідчити про їхню емоційну нестабільність. Отримані

дані вказують на те, що високі концентрації ІЛ-2 можуть мати негативні наслідки для психоемоційного стану тварин.

Аналіз рухової активності тварин інтактної групи та групи, що отримувала фізіологічний розчин, виявив високу ступінь подібності. Лише на шостому тижні спостерігалось незначне підвищення рухової активності в центрі поля та кількості вертикальних стійок у тварин V групи.

Результати тесту «відкрите поле» (рис. 3.23) вказали на значущі відмінності між досліджуваними групами тварин за рівнем емоційної реактивності, тривожності та стрес-реактивності.

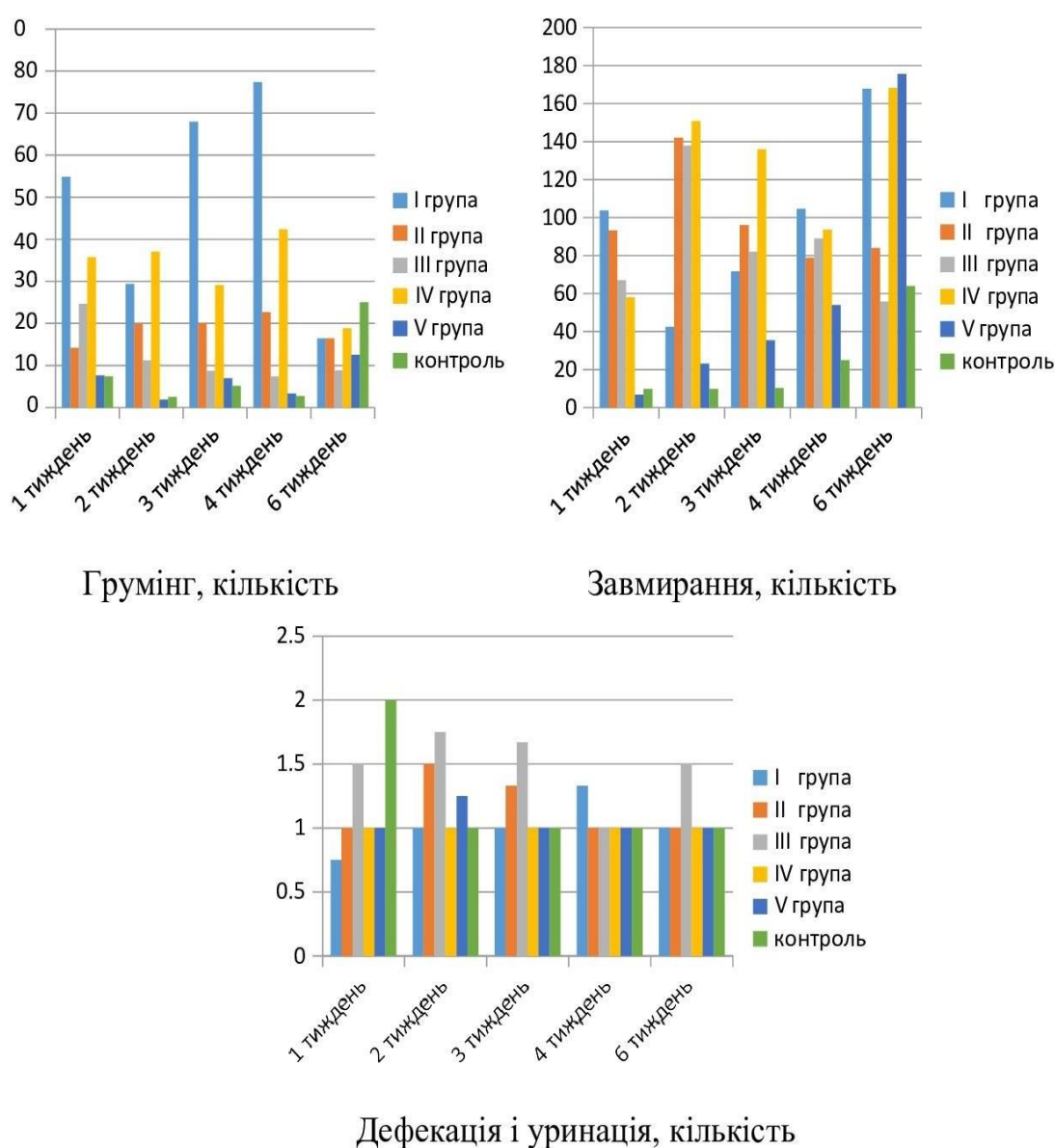


Рис. 3.23. Динаміка поведінкових показників у тесті «Відкрите поле» (грумінг, завмирання, дефекація та уринація)

Протягом перших чотирьох тижнів дослідження тварини I групи демонстрували значно більше часу, присвяченого грумінгу, порівняно з іншими групами. У IV групі цей показник був нижчим, але все ж вищим, ніж в інших групах. Однак, до шостого тижня експерименту спостерігалася тенденція до стабілізації та вирівнювання показників грумінгу в усіх групах.

Протягом усього експерименту спостерігалися значні коливання в тривалості реакції завмирання у тварин різних груп. Найбільш тривалими періоди завмирання були зафіксовані у I групи на шостому тижні, причому цей показник був близьким до відповідних показників у IV та V групах. У II та III групах тривалість завмирання була відносно стабільною протягом більшої частини експерименту, за винятком значного сплеску на другому тижні. У IV групі спостерігалася поступове підвищення часу завмирання протягом усього дослідження, за винятком першого тижня. Найнижчі та найстабільніші показники завмирання були характерні для контрольної та V груп. Незважаючи на відмінності між групами, всі тварини демонстрували розвиток реакцій страху та тривоги під час знаходження в новому середовищі «відкритого поля». Порівняльний аналіз показав, що кількість актів дефекації у тварин різних груп мала значні відмінності. Зокрема, тварини III групи демонстрували підвищену частоту дефекації на початку та в кінці експерименту.

3.3. Оцінка фізичної витривалості мишей за результатами тесту Порсольта (примусове плавання з вантажем)

Аналіз рисунка 3.24 показав, що максимальна тривалість плавання в тесті Порсольта у I та III групах дослідних тварин була досягнута на шостому тижні експерименту. Водночас, у II та IV групах експериментальних тварин пік фізичної працездатності припав на четвертий тиждень, після чого спостерігалася незначне недостовірне зниження до кінця експерименту.

Протягом експерименту спостерігалася стійке підвищення фізичної витривалості тварин I групи: на другому тижні вона зростає на 63 %, на четвертому – на 44,4 %, а на шостому – на 32 %.

У II групі спостерігалася нерівномірна динаміка фізичної тренуваності: помітне зростання на 1, 3 та 4 тижнях (на 10,4 %, 44 % та 27,4 % відповідно) чергувалося з незначним зниженням на 2 та 6 тижнях (на 6,3 % та 8,7 % відповідно). Найбільш виражене підвищення фізичної витривалості було зафіксовано на третьому тижні.

Тварини III групи демонстрували стійке підвищення часу плавання протягом всього експерименту, з найбільш вираженим приростом на 2, 3 та 6 тижнях (відповідно 58,9 %, 20,9 % та 29,6 %).

Найбільш значне підвищення фізичної витривалості у тварин IV групи було зафіксовано на третьому тижні експерименту (39,1 %).

У V групі тварин спостерігалася різке підвищення часу плавання на другому тижні (на 61,2 %), після чого показник досяг максимуму на третьому тижні, а потім незначно знизився.

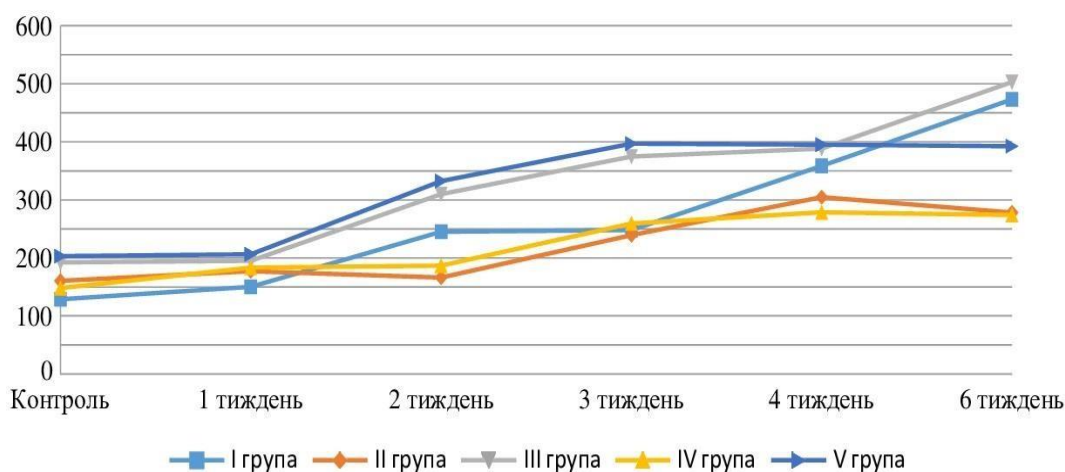


Рис. 3.24. Оцінка фізичної працездатності мишей при модуляції рівня інтерлейкіну-2, с

Всі дослідні групи продемонстрували значне підвищення фізичної витривалості наприкінці експерименту. Найбільш виражений приріст часу примусового плавання був зафіксований у I групі (267,4 %), що свідчить про високу ефективність застосованої методики тренувань саме для цієї групи тварин. Групи III та IV також показали достовірний приріст (відповідно 161,65 % та 85,1 %), хоча і менш виражений, ніж у I групі. Приріст у II та V групах був менш значним і не мав достовірних відмінностей від контрольної групи.

ВИСНОВКИ

1. Створено модель цитокінового навантаження. У якості об'єкта дослідження взято білих безпородних мишей. Особливістю даної моделі є те, що вона враховує часові та кількісні характеристики цитокінового навантаження.
2. У мишей, які знаходилися під впливом цитокінів, відбулися зміни лейкограми, а саме: незначне коливання кількості юних нейтрофілів. У групі, якій вводили цитокін у концентрації 5000 мо/кг збільшилась кількість сегментоядерних та паличкоядерних нейтрофілів. У групі, яка отримувала цитокін 7500 мо/кг спостерігалася та ж тенденція, а також зросла кількість лімфоцитів. Концентрація 30000 мо/кг, спричиняла зростання кількості всіх нейтрофілів та моноцитів, а кількість лімфоцитів при цьому різко спадала. З'ясовано, що існує загальна тенденція до посилення окисного стресу внаслідок активації нейтрофілів під впливом цитокінового навантаження.
3. Показано, що рухова активність у мишей I дослідної групи з інгібуванням цитокінового впливу, була достовірно меншою в середині та наприкінці експерименту. У мишей, що отримували цитокін в концентрації 5000 МО/кг, спостерігалася збільшення рухової активності у середині та наприкінці експерименту. У групах тварин, які тримували цитокін в середній та високій концентрації (7500 МО/кг та 30000 МО/кг відповідно), спостерігалася емоційна нестабільність тварин, що може вказувати на негативний вплив великих доз.
4. Емоційна реактивність, тривожність та стрес-реактивність досліджуваних мишей змінювалися під час експерименту, демонструючи дозозалетний та часозалежний характер. У тварин всіх груп під час знаходження їх в новій ситуації розвиваються реакції емоційної реактивності та страху.
5. Фізична працездатність тварин залежить від цитокінового навантаження. Середні та малі дози покращують показники фізичної витривалості.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, Klunker S, Meyer N, O'Mahony L, Palomares O, Rhyner C, Ouaked N, Schaffartzik A, Van De Veen W, Zeller S, Zimmermann M, Akdis CA. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Mar;127(3):701-21.e1-70..
2. Baldo BA. Side effects of cytokines approved for therapy. *Drug Saf*. 2014 Nov;37(11):921-43. doi: 10.1007/s40264-014-0226-z.
3. Bernheim HA, Kluger MJ. Fever and antipyresis in the lizard *Dipsosaurus dorsalis*. *Am J Physiol*. 1976; 231:198–203.
4. Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth*. 1996 Jul;77(1):110-7. doi: 10.1093/bja/77.1.110.
5. Chatenoud, L.; Ferran, C.; Bach, J.F. The anti-CD3-induced syndrome: A consequence of massive in vivo cell activation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. **1991**, 174, 121–134.
6. Chousterman, B.G.; Swirski, F.K.;Weber, G.F. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin. Immunopathol*. **2017**, 39, 517–528.
7. Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol*. 2007 Nov;37 Suppl 1(Suppl 1):S34-45. doi: 10.1002/eji.200737772. PMID: 17972343; PMCID: PMC3140102
8. Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol* 1998; 16:457–499
9. Driscoll KE, Carter JM, Hassenbein DG, Howard B. Cytokines and particle-induced inflammatory cell recruitment. *Environ Health Perspect*. 1997 Sep;105 Suppl 5(Suppl 5):1159-64. d, a
10. Du YX, Ye L, Song ZJ, Lv H, Liu Q, Li SG, Liu SS, Hong J, Gao Y, Schneider ME, Du WD. Development of a dendrimer PAMAM-based gold biochip for rapid and sensitive detection of endogenous IFN- γ and anti-IFN- γ IgG in patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Mol Med Rep*. 2020 Dec;22(6):5369-5377. doi: 10.3892/mmr.2020.11605.

- 11.Fajgenbaum DC, June CH. Cytokine Storm. *N Engl J Med*. 2020 Dec 3;383(23):2255-2273. doi: 10.1056/NEJMra2026131.
- 12.Gogas H, Ioannovich J, Dafni U, et al. Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon. *N Engl J Med*. 2006;354:709–18.
- 13.Hansen G, Hercus TR, McClure BJ, Stomski FC, Dottore M, Powell J, Ramshaw H, Woodcock JM, Xu Y, Guthridge M, McKinstry WJ, Lopez AF, Parker MW. The structure of the GM-CSF receptor complex reveals a distinct mode of cytokine receptor activation. *Cell*. 2008 Aug 8;134(3):496-507. doi: 10.1016/j.cell.2008.05.053.
- 14.Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*. 2003 Aug 15;374(Pt 1):1-20. doi: 10.1042/BJ20030407
- 15.Hoekstra ME, Slagter M, Urbanus J, Toebes M, Slingerland N, de Rink I, Kluin RJC, Nieuwland M, Kerkhoven R, Wessels LFA, Schumacher TN. Distinct spatiotemporal dynamics of CD8⁺ T cell-derived cytokines in the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2024 Jan 8;42(1):157-167.e9. doi: 10.1016/j.ccell.2023.12.010.
- 16.Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet*. 2001; 29:301–305. [PubMed: 11687797]
- 17.Holtmann H, Resch K. Cytokines. *Naturwissenschaften*. 1995 Apr;82(4):178-87. doi: 10.1007/BF01143192. PMID: 7753203
- 18.Jarczak D, Nierhaus A. Cytokine Storm-Definition, Causes, and Implications. *Int J Mol Sci*. 2022 Oct 3;23(19):11740. doi: 10.3390/ijms231911740.
- 19.Jin Y, Mailloux CM, Gowan K, Riccardi SL, LaBerge G, Bennett DC, Fain PR, Spritz RA. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *N Engl J Med*. 2007; 356:1216–1225. [PubMed:17377159]

- 20.Joachim Grötzinger, Molecular mechanisms of cytokine receptor activation,Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Volume 1592, Issue 3, 2002, Pages 215-223, ISSN 0167-4889, [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(02\)00316-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(02)00316-6).
- 21.Justiz Vaillant AA, Qurie A. Interleukin. 2022 Aug 22. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 29763015.
- 22.Kupsa, Tomáš & Horacek, Jan M & Jebavy, Ladislav. (2012). The role of cytokines in acute myeloid leukemia: A systematic review. Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia. 156. 10.5507/bp.2012.108.
- 23.Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell. 2010 Jun 25;141(7):1117-34. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.011.
- 24.Letzelter F, Wang Y, Sebald W. The interleukin-4 site-2 epitope determining binding of the common receptor gamma chain. Eur J Biochem. 1998 Oct 1;257(1):11-20. doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2570011.x.
- 25.Liu C, Chu D, Kalantar-Zadeh K, George J, Young HA, Liu G. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. Adv Sci (Weinh). 2021 Aug;8(15):e2004433. doi: 10.1002/advs.202004433. Epub 2021 Jun 10. PMID: 34114369; PMCID: PMC8336501.
- 26.Liu G, Bursill C, Cartland SP, Anwer AG, Parker LM, Zhang K, Feng S, He M, Inglis DW, Kavurma MM, Hutchinson MR, Goldys EM. A Nanoparticle-Based Affinity Sensor that Identifies and Selects Highly Cytokine-Secreting Cells. iScience. 2019 Oct 25;20:137-147. doi: 10.1016/j.isci.2019.09.019.
- 27.Liu G, Jiang C, Lin X, Yang Y. Point-of-care detection of cytokines in cytokine storm management and beyond: Significance and challenges. View (Beijing). 2021 Aug;2(4):20210003. doi: 10.1002/VIW.20210003.
- 28.Liu G, Zhang K, Nadort A, Hutchinson MR, Goldys EM. Sensitive Cytokine Assay Based on Optical Fiber Allowing Localized and Spatially Resolved Detection of Interleukin-6. ACS Sens. 2017 Feb 24;2(2):218-226.

doi: 10.1021/acssensors.6b00619

- 29.Livnah O, Stura EA, Johnson DL, Middleton SA, Mulcahy LS, et al. Functional mimicry of a protein hormone by a peptide agonist: the EPO receptor complex at 2.8 Å *Science*. 1996;273:464–71.
- 30.Lorenzen I, Dingley AJ, Jacques Y, Grotzinger J. The structure of the interleukin-15 α receptor and its implications for ligand binding. *J Biol Chem*. 2006;281:6642–47
- 31.Marz P, Herget T, Lang E, Otten U, Rose-John S: Activation of gp130 by IL-6/soluble IL-6 receptor induces neuronal differentiation. *Eur J Neurosci* 1997, 9:2765-2773
- 32.Marz P, Otten U, Rose-John S: Neuronal activities of IL-6-type cytokines often depend on soluble cytokine receptors. *Eur J Neurosci* 1999, 11:2995-3004
- 33.Metcalf, Riley & Putoczki, Tracy & Griffin, Michael. (2020). Structural Understanding of Interleukin 6 Family Cytokine Signaling and Targeted Therapies: Focus on Interleukin 11. *Frontiers in Immunology*. 11. 1424. 10.3389/fimmu.2020.01424
- 34.Molecular cell biology. Lodish, Harvey 5 ed: - New York : W. H. Freeman and Co., 2003, 973 s.
- 35.Nedoszytko B, Sokołowska-Wojdyło M, Ruckemann-Dziurdzińska K, Roszkiewicz J, Nowicki RJ. Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of the inflammatory skin diseases: atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis. *Postepy Dermatol Alergol*. 2014 May;31(2):84-91. doi: 10.5114/pdia.2014.40920.
- 36.Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*. 2000 Apr;117(4):1162-72. doi: 10.1378/chest.117.4.1162.
- 37.Oppenheim JJ. Cytokines: past, present, and future. *Int J Hematol*. 2001 Jul;74(1):3-8. doi: 10.1007/BF02982543.
- 38.Ozaktay AC, Kallakuri S, Takebayashi T, et al. Effects of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor on sensitivity of dorsal root ganglion and peripheral receptive fields in rats. *Eur Spine J* 2006;1–9

39. 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 доступа: <http://www.nature.com/nature/journal/v266/n5604/abs/266730a0.html>
40. Quimby, Fred & Ridenour, Nancy. *The Immune System: Red Cell Agglutination in Non-Humans*
41. Rose-John S. Cytokines come of age. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Nov 11;1592(3):213-4. doi: 10.1016/s0167-4889(02)00359-2. PMID: 12421666
42. Rudd, K.E.; Johnson, S.C.; Agesa, K.M.; Shackelford, K.A.; Tsoi, D.; Kievlan, D.R.; Colombara, D.V.; Ikuta, K.S.; Kiso, N.; Finfer, S.; et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: Analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* **2020**, 395, 200–211.
43. Saito K, Kobayashi D, Sasaki M, Araake H, Kida T, Yagihashi A, Yajima T, Kameshima H, Watanabe N. Detection of human serum tumor necrosis factor-alpha in healthy donors, using a highly sensitive immuno-PCR assay. *Clin Chem*. 1999 May;45(5):665-9. PMID: 10222353.
44. Skiniotis G, Boulanger MJ, Garcia KC, Walz T. Signaling conformations of the tall cytokine receptor gp130 when in complex with IL-6 and IL-6 receptor. *Nat Struct Mol Biol*. 2005 Jun;12(6):545-51. doi: 10.1038/nsmb941.]
45. Skiniotis G, Lupardus PJ, Martick M, Walz T, Garcia KC. Structural organization of a full-length gp130/LIF-R cytokine receptor transmembrane complex. *Mol Cell*. 2008 Sep 5;31(5):737-48. doi: 10.1016/j.molcel.2008.08.011.
46. Spangler JB, Moraga I, Mendoza JL, Garcia KC. Insights into cytokine-receptor interactions from cytokine engineering. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:139-67. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120211. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4445396/>

47. Sprecher CA, Grant FJ, Baumgartner JW, Presnell SR, Schrader SK, et al. Cloning and characterization of a novel class I cytokine receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;246:82–90.
48. Stephanie M. Rollmann *et al.* Proteinaceous Pheromone Affecting Female Receptivity in a Terrestrial Salamander. *Science* **285**, 1907–1909 (1999). DOI: [10.1126/science.285.5435.1907](https://doi.org/10.1126/science.285.5435.1907)
49. The Hallmarks of Cancer, Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg, *Cell*, Vol. 100, 57–70, January 7, 2000. http://www.weizmann.ac.il/home/fedomany/Bioinfo05/lecture6_Hanahan.pdf
50. Thomas D Mueller, Jin-Li Zhang, Walter Sebald, Albert Duschl, Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Volume 1592, Issue 3, 2002, Pages 237–250, ISSN 0167-4889, [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(02\)00318-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(02)00318-X).
51. Vacchelli E, Eggermont A, Fridman WH, et al. Immunostimulatory cytokines. *OncoImmunology.* 2013;e24850. <http://dx.doi.org/10.4161/onci.24850>.
52. Wang X, Lupardus P, Laporte SL, Garcia KC. Structural biology of shared cytokine receptors. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:29–60. doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090616. PMID: 18817510;
53. Watkins LR, Milligan ED, Maier SF. Glial proinflammatory cytokines mediate exaggerated pain states: implications for clinical pain. *Adv Exp Med Biol* 2003;521:1–21.
54. Whiteside T. L., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **1994**, 1, 257.
55. Xie WR, Deng H, Li H, et al. Robust increase of cutaneous sensitivity, cytokine production and sympathetic sprouting in rats with localized inflammatory irritation of the spinal ganglia. *Neuroscience* 2006;142:809–822
56. Yawata H, Yasukawa K, Natsuka S, Murakami M, Yamasaki K, et al. Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino

- acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130. *EMBO J.* 1993;12:1705–12.
- 57.Zedler S, Bone RC, Baue AE, et al. T-cell reactivity and its predictive role in immunosuppression after burns. *Crit Care Med* 1999; 27:66–72
- 58.Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007 Spring;45(2):27-37. doi: 10.1097/AIA.0b013e318034194e. PMID: 17426506; PMCID: PMC2785020.
- 59.Zhang, F., Deng, F., Liu, G. J., Middleton, R., Inglis, D. W., Anwer, A., Wang, S., & Liu, G. (2019). IFN- γ -induced signal-on fluorescence aptasensors: from hybridization chain reaction amplification to 3D optical fiber sensing interface towards a deployable device for cytokine sensing. *Molecular Systems Design and Engineering*, 4(4), 872-881. <https://doi.org/10.1039/c9me00047j>
- 60.Zhou, Q., Kwa, T., Liu, Y., & Revzin, A. (2012). Cytokine biosensors: the future of infectious disease diagnosis? *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 10(10), 1079–1081. <https://doi.org/10.1586/eri.12.102>
- 61.Гасюк О.М. Вплив інтерлейкіну-2 на адаптаційні реакції крові лабораторних мишей в умовах фізичного навантаження / В.А. Швець, С.П. Бесчасний, // Український журнал медицини, біології та спорту. – 2020. - №5. – С. 349-356.
- 62.Гасюк О.М. Клітинні основи кровотворення : навч.-метод. посіб. / О. М. Гасюк – Херсон : ФОП Вишемирський В. С., 2019. – 92 с.
- 63.Манько В.В. Основи техніки лабораторних робіт у фізіологічних дослідженнях [навчальний посібник] / Гальків М.О., Клевець М.Ю – Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2005. – 133 с.
- 64.Морфологія клітин крові лабораторних тварин і людини: Атлас / В. М. Запорожан, В. К. Напханюк, Н. О. Горянова та ін. - Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2002. - 118 с.
- 65.Практикум з біологічної хімії [Текст]: Навчальний посібник / М. В. Шевряков, Б. В. Яковенко, О. Ф. Явоненко. – Суми : ВТД "Університетська книга", 2003. – 204 с.

66. Швець В. А. Участь цитокінів в адаптації до фізичного навантаження / В. А. Швець // Альманах науки. – 2019. – № 6/1 (27). – С. 4-6.
67. Швець В. А. Участь цитокінів у адаптаційних реакціях (огляд літератури) / В. А. Швець, О. М. Гасюк // Природничий альманах (біологічні науки). Вип. 27. – Херсон: ФОП Вишемирський В. С., 2019. – С. 145-161. DOI: 10.32999/ksu2524-0838/2019-27-10
68. Швець В. А. Фізична тренованість білих мишей під час плавання в умовах стимуляції та інгібування інтерлейкіну-2 / В. А. Швець, О. М. Гасюк // Український журнал медицини, біології та спорту – 2020 – Т. 5, № 4 (26). – С. 395-400. DOI: 10.26693/jmbs05.04.395
69. Швець В. Лабораторна біологічна практика : методичні рекомендації для студентів спеціальності 091 Біологія, 014 Середня освіта (Біологія та здоров'я людини) першого (бакалаврського) рівня вищої освіти / А. Шкуропат, І. Головченко, В. Швець. – Херсон: ФОП Вишемирський В. С., 2020. – 34 с. ISBN 978-617-7941-09-4 (електронне видання).
70. Швець ВА, Дьяченко НА. Вплив інтерлейкіну-2 на поведінкову активність у тесті "відкрите поле" при фізичному навантаженні. VI Міжнародна заочна науково-практична конференція «Актуальні питання біологічної науки»: Збірник статей. Ніжин: НДУ імені Миколи Гоголя, 2020. С. 117-120.