

**ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ БІОЛОГІЇ, ГЕОГРАФІЇ І ЕКОЛОГІЇ
КАФЕДРА БІОЛОГІЇ ЛЮДИНИ ТА ІМУНОЛОГІЇ**

**ВПЛИВ АДРЕНАЛІНУ НА ФАГОЦИТАРНУ АКТИВНІСТЬ
МОНОЦИТІВ**

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

Виконала: студентка
Спеціальності 091 Біологія
Освітньо-професійної програми
«Біологія»
Сурайкіна Анастасія В'ячеславівна

Керівник к.б.н., доцент Гасюк О.М.
Рецензент к.б.н., доцент Мельник Р.П.

Херсон – 2020

ЗМІСТ

ВСТУП	3
РОЗДІЛ 1. Огляд літературних джерел.....	6
1.1. Роль адреналіну у нейроімуноендокринних взаємодіях.....	6
1.2. Зміни фагоцитарної активності під впливом різних факторів.....	12
1.3. Моноцити - як особливі фагоцити імунної системи.....	16
РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи дослідження.....	20
2.1. Схема експериментального дослідження	20
2.2. Метод дослідження фагоцитарної активності.....	21
РОЗДІЛ 3. Аналіз та обговорення отриманих результатів.....	26
3.1. Показники поглинальної функції моноцитів периферичної крові мишей в умовах дії різних концентрацій адреналіну.	26
3.1.1. Фагоцитарний індекс моноцитів периферичної крові мишей.....	26
3.1.2. Показник фагоцитарного числа моноцитів периферичної крові мишей.....	29
3.1.3. Коефіцієнт фагоцитарного числа моноцитів периферичної крові мишей.....	33
3.2. Показники завершеності фагоцитарного акту моноцитів периферичної крові мишей в умовах дії різних концентрацій адреналіну	36
ВИСНОВКИ.....	41
.....	41
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	42

ВСТУП

Актуальність теми. Вивчення нейроімуноендокринних взаємодій є актуальною проблемою сучасної біології та медицини. Лише у 80-90 роках минулого століття була в повній мірі оцінена роль таких взаємозв'язків в регуляції всіх функцій організму [7, 12, 44, 45]. На даний час накопичено велику кількість різноманітних відомостей про вплив нейроендокринної системи на органи та клітини імунної системи [9, 35, 44, 45]. Особливий інтерес в таких дослідженнях викликають катехоламіни. Їх особливістю є те, що вони можуть швидко змінювати свій вміст у крові та тканинах в залежності від ендогенних та екзогенних впливів, що забезпечує неспецифічну пристосувальну реакцію організму [29]. Катехоламіни можуть запускати/приймати участь у диференціюванні та проліферації лімфоцитів [29], регулювати їх реактивність на імунізацію [27], забезпечувати міграцію імунокомпетентних клітин [21], впливати на функцію специфічних рецепторів [23], впливати на продукцію цитокінів і виконувати багато інших функцій [4]. Проте, навіть велика кількість даних (досить суперечливих) не дає змоги створити повну картину спектру взаємодій цих речовин.

Найбільш відомим із катехоламінів є адреналін. В імунній системі мішенями для адреналіну є Т-лімфоцити. Так, встановлено, що рівень активності зв'язування Т-лімфоцитів і адреналіну відображає ступінь активності симпатoadреалової системи при відповіді на стресорний подразник [3, 21, 27].

Показано, що стресорні впливи можуть приводити до пригнічення реакцій гуморального та клітинноопосередкованого імунітету та поглинальної активності системи мононуклеарів [4, 40].

Однак, не з'ясовано, як протилежно спрямовані зміни кількості окремих різновидів лейкоцитів (еозинофілів та нейтрофілів) при стресі

відображаються на їх функціональній активності [8]. Також, не до кінці з'ясована роль адреналіну у кістково-мозковому кровотворенні [36], при стимуляції інших клітин імунної системи [45].

Дослідження фагоцитозу не вимагає коштовного обладнання, та реактивів, а технологія досить проста у виконанні. Для роботи були використані методи, які широко використовуються у лабораторній діагностиці [17].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дане кваліфікаційна робота виконана в межах роботи над ініціативною науково-дослідною темою «Вплив деяких вазоактивних речовин на центральні та периферичні лімфоїдні органи білих мишей» (номер державної реєстрації 0117U005614).

Мета дослідження. Вивчення фагоцитарної активності моноцитів в умовах дії адреналіну як показник реакції клітин периферичної крові на стрес.

Завдання дослідження:

1. Дослідити показники поглинальної функції моноцитів периферичної крові мишей в умовах дії різних концентрацій адреналіну у порівнянні із контролем;
2. Визначити показники завершеності фагоцитарного акту моноцитів периферичної крові мишей в умовах дії різних концентрацій адреналіну у порівнянні із контролем;
3. Визначити фагоцитарну активність моноцитів периферичної крові мишей в умовах дії різних концентрацій адреналіну у порівнянні із контролем.

Об'єкт дослідження. Фагоцитарна активність моноцитів крові мишей.

Предмет дослідження. Адренергічний вплив на показники фагоцитарної активності в умовах *in vitro*.

Методи дослідження. Аналітичний огляд наукової літератури; методи вивчення фагоцитарної активності клітин крові (визначали індекс фагоцитозу, фагоцитарне число, коефіцієнт фагоцитарного числа, відсоток перетравлення, індекс перетравлення, інтегральний показник перетравлювальної активності); методи математичної статистики (пакет програм Statistica 6.0 и Microsoft Excel 7. Достовірність розбіжностей оцінювали за непараметричним критерієм Манна-Вітні. Результати вважали достовірними при $p < 0,05$).

Наукова новизна одержаних результатів. Показники фагоцитарної активності в умовах впливу адреналіну *in vitro* досліджено на лабораторних мишах, тоді як зазвичай, об'єктом таких досліджень є кров щура або морської свинки. Встановлено, що адреналін *in vitro* має різноспрямовані ефекти в залежності від дози.

Практична значущість результатів дослідження. Дані, отримані в результаті дослідження доцільно використовувати у навчальному процесі при викладанні курсу «Імунологія», «Імунопатологія» та «Адаптогенез живих систем». Стан моноцитарної ланки фагоцитозу є менш вивченим ніж нейтрофільної. Також, вивчення реакції моноцитів на дію основного медіатора стрес-реакцій є перспективним і може бути основою для створення тест-систем для визначення особливостей реакції на стрес та оцінки її ступеня.

Апробація результатів дослідження. Результати, отримані в ході виконання кваліфікаційної роботи представлені на звітній студентській конференції на кафедрі біології людини та імунології у 2019 та 2020 роках. Також за результатами є наукова публікація.

Структура роботи. Робота складається з трьох розділів, вступу, висновків, списку використаних джерел та додатків. У роботі присутні 19 рисунків і 4 таблиці.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1.1. Роль адреналіну у нейроімуноендокринних взаємодіях

Адреналін відноситься до групи катехоламінів, тобто, разом із норадреналіном, дофаміном, мають подвійну природу (є і медіаторами, і гормонами). Вони мають спільні та взаємопов'язані шляхи синтезу та обміну в організмі (рис. 1.1) [28, 29].

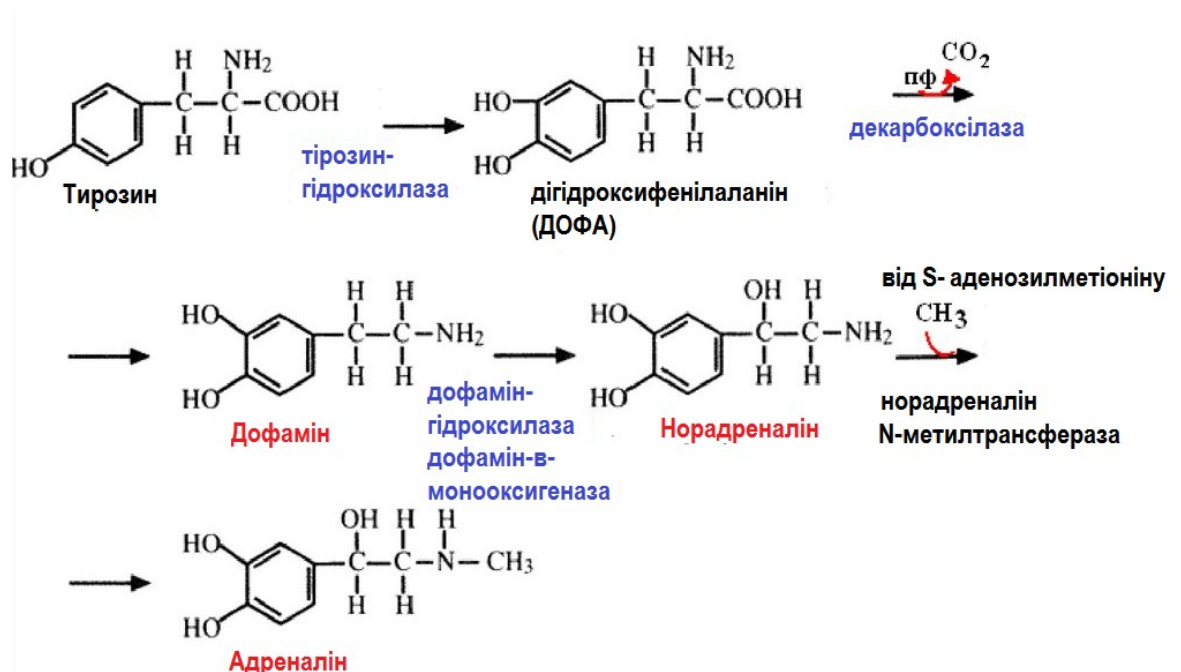


Рис.1.1. Утворення та взаємозв'язок катехоламінів

Завдяки наявності майже на всіх клітинах рецепторів до вищеперахованих речовин, вони мають вплив на всі тканини і органи та, разом з іншими біологічно-активними речовинами, регулюють величезну кількість фізіологічних процесів. Загальний механізм їх дії представлено на рисунку 1.2. Якщо ж узагальнити всі їх функції, то вони допомагають організму функціонувати та долати стрес (гострий і хронічний) [29].

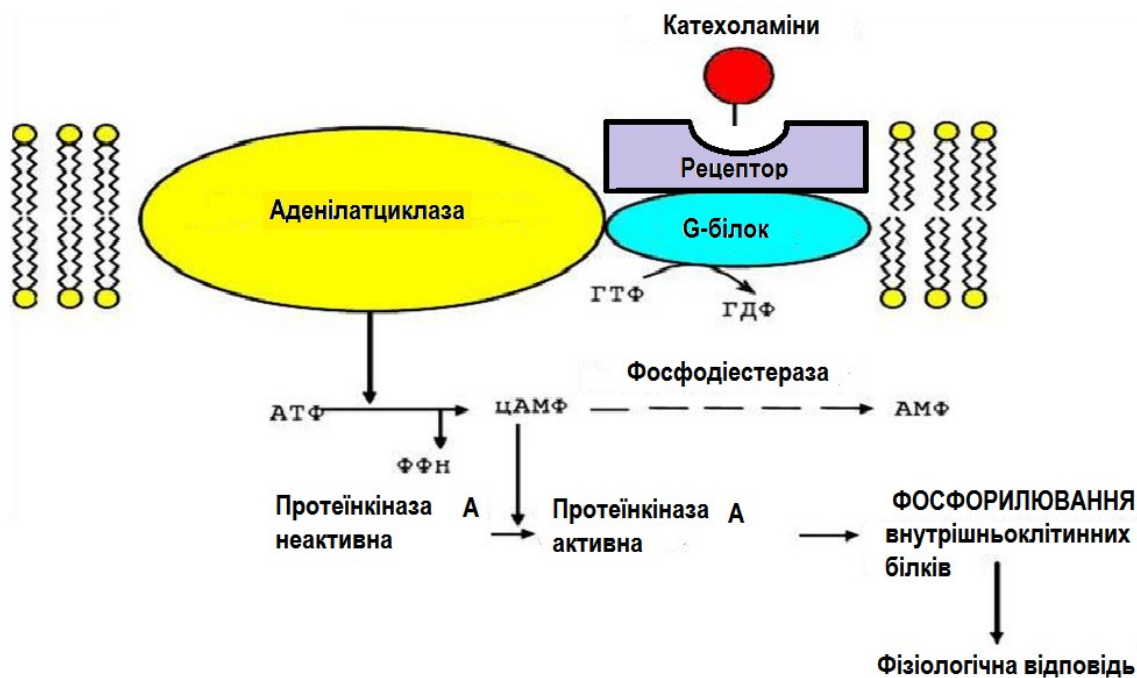


Рис. 1.2. Загальний механізм дії катехоламінів

З моменту відкриття Г.Сельє і дотепер стрес є постійним об'єктом досліджень науковців. Він спричиняє чисельні та різноманітні впливи на фізичні, психічні, соціальні аспекти життєдіяльності, зумовлює поведінку, опосередковано впливає на тривалість життя. Через поняття стресу можна пояснити усі різноманітні прояви життєдіяльності та можливості та засоби адаптації організму до навколишнього світу [8].

Іноді стрес розглядають як типовий (неспецифічний) патологічний процес (формування мобілізаційного пакету захисних, компенсаторних, іноді патологічних реакцій організму, у відповідь на дію стрессоров-загрозників гомеостазу [28, 30].

Мабуть одну з головних ролей у стресовій мобілізації організму має нейроімуноендокринна система (гіпоталамо-гіпофізарно-надниркова система, симпатична нервова система, тімус, лімфатична система, червоний кістковий мозок, периферична кров, система кровообігу [40].

Гіпоталамо-гіпофізарно-надниркова система, симпатична нервова система активуються на ранніх стадіях стресу та виділяють головні

гормони стресу - кортиколиберин, аденокортикотропний гормон кортикостероїди, адреналін, норадреналін, (рис. 1.3) [29, 42].



Рис. 1.3. Розвиток генералізованої реакції на стрес

Адаптивні реакції на дію стресора спрямовані на попередження розвитку порушень гомеостазу.

Цікаві результати отримано про дослідження впливу різних катехоламінів та їх концентрацій на стан периферичної крові та вміст в ній імунокомпетентних речовин та клітин [29]. З'ясовано, що катехоламіни мають позитивну кореляцію із концентрацією в крові ІЛ-6. Дофамін та адреналін пригнічують синтезування протизапальних цитокінів (зокрема, ІЛ-10). Дофамін та норадреналін стимулюють проліферацію у лімфоїдних органах імунокомпетентних клітин. Також катехоламіни мають вплив на формування Т-лімфоцитів хелперного типу та ще стимулюють їх функціональну активність. І, насамкінець,

підвищені концентрації катехоламінів асоційовані з підвищенням концентрації білків-реагінів на тлі зниження концентрації IgA, а дофамін та адреналін, додатково, збільшують вміст IgM [9, 29].

Із змінами рівня вмісту адреналіну в крові позитивний кореляційний зв'язок демонструє кількість в крові NK-клітин (натуральних кілерів) та В-лімфоцитів. Такий же позитивний зв'язок має норадреналін із загальною кількістю Т-лімфоцитів (особливо популяції Т-хелперів (субпопуляцій $CD4^+$). Існує велика кількість ефектів катехоламінів на стан імунокомпетентної системи, а також відповідних ефектів та супутніх відповідей про- та протизапального генезу в ході розвитку стресу [28]. Якими є ці ефекти та відповіді? Пригнічення проліферативної активності лімфоцитів; стимуляція та регулювання продукування антитіл Ig A, Ig G, Ig M; імунних комплексів, що циркулюють; пригнічення вироблення IL-6; зниження синтезу фактора некрозу пухлин- α ; порушення процесів праймінгу та активації Т-лімфоцитів (найбільше це стосується їх субпопуляції NK-клітин ($CD3^-/CD56^+$), деяке зниження експресії молекул адгезії та різке збільшення кількості лімфоцитів $CD16^+/CD56^+$ у вільному кровотоку; зниження величини популяції Т-лімфоцитів $CD3^+/CD4^+$ при незначному прямому кореляційному зв'язку із збільшенням кількості $CD8^+$ Т-лімфоцитів; зниження ефективності та швидкості антитілозалежної клітинної токсичності [28, 42].

Типовими змінами системи крові при стресі є нейтрофільний лейкоцитоз, лімфопенія та еозинопенія. Зараз іде активне вивчення таких змін при стресі у взаємозв'язку з механізмами резистентності організму [40]. Отримані в дослідженні відомості доводять важливу роль активації фагоцитів у підвищенні резистентності організму при стресі та включення адренергічних механізмів в цей процес [40]. При стресі спостерігається підвищення фагоцитарної активності лейкоцитів периферичної крові. Зміни показників нейтрофільного фагоцитозу в

умовах стресу мають двочастковий характер. Перша частина характеризується зниженням відносних та підвищенням абсолютних параметрів нейтрофільного фагоцитозу, а друга – збільшенням і абсолютних і відносних показників. Підвищення сумарної фагоцитарної активності нейтрофілів в першу частину досягається за рахунок збільшення їх кількості у вільній циркуляції. Автори вважають, що перша фаза співпадає із розвитком загальної тривоги, а друга – із стадією підвищення резистентності [40, 45].

Дослідженнями Брошкова М.М. на собаках показано, що при високій сенсibiliзації організму цуценяти до адреналіну, в периферичній крові тварин спостерігають зниження кількості наступних клітин: абсолютної кількості лімфоцитів, лейкоцитів, абсолютної кількості Т-супресорів та Т-хелперів, абсолютної кількості натуральних кілерів та клітин, здатних до фагоцитозу [3].

За результатами Чумаченка В.А. виходить, що стан організму молодих свиней в умовах початку дії стрес фактора і потім характеризується наступними змінами: зменшенням загальної кількості лімфоцитів (загальна кількість, Т-лімфоцити (активні), Т- і В-лімфоцити), бактеріоцидної і лізоцинової активності сироватки, титру антитіл (нормальних), індексу завершеності фагоцитозу нейтрофілів [38].

Є дані про спрямованість ефектів адреналіну і β -адренергічного агоніста тербуталіна сульфату на фагоцитарну активність лейкоцитів *in vitro*, що дозволяють вважати, що пізні ефекти дії блокатора адреналіну (пропроналолу) пов'язані з фазними змінами експресії β -блокаторів після скасування їх блокади. Абсолютне число еозинофілів істотно не змінювалося. Збільшення абсолютного числа лімфоцитів, моноцитів і нейтрофілів через 48 годин від початку експерименту призводило до збільшення загального числа лейкоцитів [12].

У мишей, схильних до гострого стресу, перед підшкірної імплантацією хірургічної губки відзначено 2-3-кратне збільшення інфільтрації нейтрофілами, макрофагами, НК-клітинами і Т-лімфоцитами в порівнянні з нестресованими тваринами [35].

Тож, отримані результати вказують на наявність фазних змін чутливості фагоцитуючих клітин до адренергічної регуляції, що може бути пов'язано зі змінами експресії відповідних рецепторів і / або трансдукції з них регуляторних сигналів на внутрішньоклітинному рівні [12].

Отже, стрес може впливати на імунну функцію на клітинному рівні (фагоцитоз, антиген-презентування, цитотоксичність, продукція антитіл) і / або через перерозподіл лейкоцитів, який може підвищувати або знижувати кількість певних популяцій клітин в досліджуваному компартменті імунної системи. [35].

1.2. Зміни фагоцитарної активності під впливом різних факторів

Подразники, які діють на живий організм, можна вважати стресорами, адже їх дія завжди виводить організм із стану функціональної рівноваги. Тож, реакція на дію стресових факторів може вважатися базовою індивідуальною властивістю організму [8, 41].

Для формування та підтримання у належному стані пристосувальних механізмів необхідним є безперервний обмін інформацією між рівнями керування у організмі [7, 9] управління. Інформація, яку закладено у функціональну (у нашому випадку фагоцитарну) активність фагоцитів периферичної крові, кодується та опосередковується мозковою діяльністю, та може бути використана для оцінки регуляторних механізмів, що охарактеризовують адаптаційні можливості організму [7, 9, 28, 41].

Фагоцитоз є базовим процесом імунної системи. Саме він є основою неспецифічного імунітету та, в певній мірі, основою і специфічних імунних реакцій [41]. Фагоцити (клітини, що здатні до фагоцитозу) не є однорідною групою, а мають багато різновидів (рис. 1.4).

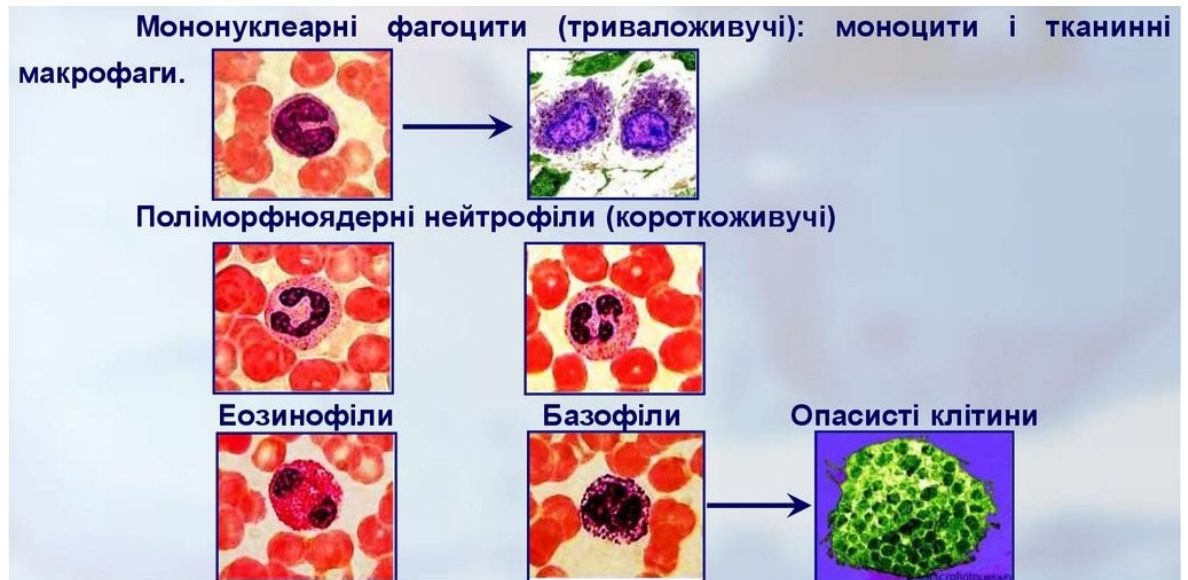


Рис. 1.4. Типи фагоцитуючих клітин

Такі автори як Гаєвська В.Ю., Гаєвський В.Ю., Ковалишин О.А., [5] доводять, що вивчення фагоцитів та їх функціональних резервів можуть бути додатковими біомаркерами в лабораторній діагностиці. Вони вважають, що у осіб, хворих на системну склеродермію (хвороба легенів) діагностика фагоцитарної активності дає змогу підозрювати та діагностувати окремі особливості ушкодження легень, а це надає можливості для своєчасного призначення лікування. Авторами виявлені такі зміни фагоцитарної ланки у обстежених осіб, які дають змогу припустити можливу активацію механізму нейтрофільного фагоцитозу на тлі зниження фагоцитарної функції моноцитів. Ці зміни фагоцитарних клітин не є позитивними для імунної системи, адже мають певні негативні наслідки: бути тлом для формування запальних та аутоімунних агресивних процесів за умов розвитку склеродермії [5]. Наприклад, активація латентних інфекцій: вірус Епштейна-Барр,

Mycoplasma pneumoniae, цитомегаловірус, *Chlamydia pneumoniae*, герпес тощо, як мають тропність до легневих структур [46]. Відомо, що вищевказані інфекції теж можуть сприяти активізації запальних фіброзних та судинних процесів через надмірну активацію системи нейтрофільних фагоцитів [48].

Роботами Бєсчасного С.П. показано, що через механізми нейроімуноендокринних взаємодій, фагоцитарна активність змінюється у дітей із аутоімунною нейросенсорною туговухістю. У дітей із нейросенсорною туговухістю показники фагоцитозу (нейтрофілів і моноцитів периферичної крові) були зниженими (фагоцитарний індекс та фагоцитарне число). Більш детальне вивчення функціонального стану гранулоцитарно-моноцитарного імунітету показало підвищений вміст лужної фосфатази в гранулах фагоцитів з одночасним зниженням вмісту в них мієлопероксидази та катіонних білків [2].

Активну участь фагоцитів та зміни їх активності в умовах дії стрес факторів різної природи показано у роботах Pellme S. та співавторів [46].

З'ясовано, що пряму залежність від дії адреналіну та його похідних мають показники морфологічні та фізіологічні показники периферичної крові у вівців. Формування клітинного імунітету ягнят пов'язане з чутливістю та резистентністю фагоцитів та опосередковане через різну стійкість до адренергічних впливів [1].

Кузнецова Е. И., Чепелева М. В., Камшилов Б. В. досліджують показники фагоцитарної активності у хворих з ендопротезами. Ними показано, що фагоцитарну активність можна використовувати як діагностичний експрес-тест для оцінки відновлення у пізньому післяопераційному періоді. У разі розвитку ранньої нестабільності ендопротеза, спостерігається збільшення кількості активних фагоцитів в периферичної крові при збереженні поглинальної та лізуючої здібності нейтрофілів. При наявності млявої запальної реакції в зоні нестабільного ендопротезу в крові підвищується кількість активних фагоцитів на тлі

зниження перетравлюючої здібності нейтрофільний фагоцитів. Найбільш інформативними є показники фагоцитарний показник, показник завершеності фагоцитозу та кількість активних фагоцитів [17].

Доведено, що $CD3^+/CD56^+$ а, особливо, $CD3^-/CD56^+$ мають змогу чинити імуномодулюючі ефекти завдяки своїй здатності синтезувати токсичні речовини (лізини) до власних та іншородних клітин з лігандами, а також здатності синтезувати та секретувати специфічні цитокіни, що здійснюють імунотоксичні реакції з патогенами через інші клітини (наприклад, фагоцити) [28].

Досить несподівані результати були отримані при вивченні можливих проявів «імунологічної пам'яті» фагоцитуючих лейкоцитів як клітин системи уродженого імунітету. Точніше, вивчали динаміку активності фагоцитозу та прикладі поглинання *C. diphtheriae var. gravis, tox+*. Особливістю даного дослідження стало те, що намагалися «зловити» феномен запам'ятовування після повторних стимуляцій імунної системи цим антигеном. Були отримані результати, що свідчать про те, що збільшення фагоцитарної активності (кількості поглинутих нейтрофілами клітин *C. diphtheriae var. gravis, tox+*) при повторних щепленнях проявляється підвищенням ефективності фагоцитуючих нейтрофілів, а не збільшенням їхньої кількості. Автори не змогли дати переконливої інтерпретації результатів експерименту та пояснити механізми, які зумовили підвищення фагоцитарної ефективності нейтрофілів. Було, навіть, зроблене припущення про епігенетичне перепрограмування клітин уродженого імунітету. Також запропоновано гіпотезу про вплив інших клітин (насамперед макрофагів) системи неспецифічного уродженого імунітету [11]. Однак, отримані результати є дуже перспективними для створення нової комбінованої дифтерійної вакцини, що превентивно спрямована на попередження заселення збудником слизових оболонок [11].

Полетаева А. В., Леванюк А. И., Сергеева Е. В. та інші показують, що введення глюкокортикоїдів статистично достовірно не впливає на здатність клітин до фагоцитозу, але змінює здатність макрофагів до перетравлювання об'єктів фагоцитозу [26]. Хоча, у багатьох дослідженнях показано, що при взаємодії окремих видів мікробів (в першу чергу тих, що володіють аналогом лізосом та набором власних гідролітичних ферментів), все вирішує співвідношення функціональної активності фагоцитів та ферментативної активності антигена (у даному випадку живого об'єкта фагоцитозу) [11, 15, 31, 43]. При цьому зміни активності лізосомних ферментів в межах одного різновиду чи субпопуляції макрофагів-моноцитів найяскравіше проявляються при взаємодії з живим об'єктом фагоцитозу і залишаються без помітних змін при фагоцитозі мертвих мікроорганізмів чи їх фрагментів [26].

Наукові відомості про вплив тироксину (тиреоїдних гормонів) на фагоцитарну функцію є невеликими та суперечливими. Вже отримані результати показують, що існують різні механізми, що визначають резистентність фагоцитів до тироксину в умовах *in vivo* та *in vitro* (клітинна культура). Але направленість дії тироксину на активність фагоцитарної функції нейтрофілів периферичної крові в цілісному організмі цілком корелює з його ефектами в системі *in vitro*. Важливо, що вплив тироксину на фагоцитоз з боку макрофагів є різноплановим і *in vivo* НЕ опосередковується через вже відомі та гарно вивчені сигнальні шляхи [16].

Група кортикостероїдів різко знижує антититілозалежну цитотоксичність макрофагів як *in vivo*, так і *in vitro*. Особливо значно пригнічує цитотоксичність макрофагів ацетат кортизону, який викликає довгострокове підвищення вмісту кортизону в крові. Кортикостероїди є регуляторами звільнення ферментів з порожнини лізосом. Ще de Duve (1969), при дослідженні впливу кортикостероїдів на лізосоми печінки щурів *in vitro*, виявив затримку надходження β -гліцерофосфату в

гранули. У той же час було встановлено, що попереднє введення щурам кортизону перешкоджає виходу катепсина D з великих гранул [26].

Показано, що суттєвий вплив на фагоцитарну активність має лаферобіон, який, як відомо, є препаратом, створеним на основі рекомбінантного людського інтерферону альфа-2b. Тож, інтерферони є важливим фактором корекції фагоцитарної активності. Лаферобіон показав позитивний вплив на показники фагоцитарної активності, фагоцитарного числа та покращив індекс бактерицидності [32].

Показано, що герудотерапія має вплив на фагоцитарну функцію. Так, у осіб після лікування медичними п'явками відзначені знижені значення показників фагоцитарної активності: головним чином коефіцієнт активності фагоцитів, який разом з фагоцитарним числом є найбільш істотним показником при оцінці фагоцитарної активності. В процес п'явкотерапії виявлена активація початково знижених показників фагоцитарної активності, яка супроводжувалася підвищенням всіх вивчених показників фагоцитозу. Це, можливо, пов'язано з активацією вродженого імунітету [34].

1.3. Моноцити - як особливі фагоцити імунної системи

Моноцити периферичної крові (рис. 1.5), здається, є не досить важливими в плані визначення фагоцитарної активності (внеску в неї), але визначення їх функціональних особливостей надзвичайно необхідне для того, щоб оцінити їх майбутню здатність до ефективного фагоцитозу у якості тканинних макрофагів.

У роботах Коленчукової О.А., Сарматової Н.И., Мошева А.В. [15] зазначається, що моноцити периферичної крові, які довгий час визначали як монолітну групу клітин, розділяються (на основі визначення функціональної активності та отримання експресії поверхневих антигенів) на кілька відрізняючихся популяцій [43, 44].

Так, циркулюючі в периферичній крові моноцити за фенотипом можна розділити на дві популяції (як мінімум), які розрізняють за експресією лігандів (рецепторний комплекс для бактеріального липополисахарида CD14) [43, 44].

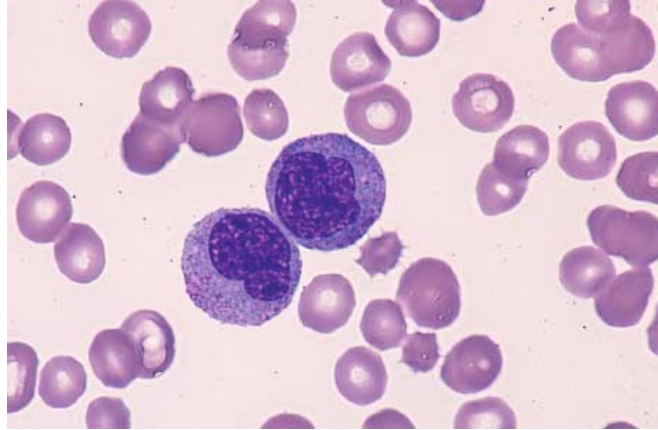


Рис. 1.5. Моноцити периферичної крові (Micromed, цифрова камера eTREK DCM 320 – 3.0 M)

Збільшення кількості клітин з CD14 спостерігається при різних патологіях, як то сепсис, бактеріальні та вірусні гострі і хронічні запальні захворювання. Клітини, тільки з CD14 на своїй поверхні називають «класичними моноцитами» (до 95% в нормі). Моноцити, з фенотипом CD14⁺ CD16⁺, називають «некласичні» (прозапальні). Також може виділятися додаткова група моноцитів (фенотип CD14^{dim}CD16⁺ або CD14²⁺ CD16⁺, які названо «проміжний тип» [43, 44].

Показано, що моноцити різних популяцій можна розрізнити і за функціональними властивостями (здатність до фагоцитозу, профіль синтезованих хемокінів та цитокінів, синтез і секреція активних форм O₂ та NO₂, рівень «респіраторного вибуху», хемілюмінесцентна активність клітин) [15].

Фагоцитарна активність моноцитів може здійснюватися в залежності від їх популяційного складу в периферичній крові. Великі клітини з високим рівнем фагоцитарної активності називають «класичні» моноцити, а невеликі клітини зі зниженою оксидажною та

фагоцитарною активністю та зниженим рівнем «респіраторного вибуху», називають «некласичні» моноцити. «Проміжний» тип моноцитів називається ще «прозапальний», так як володіє великою продукцією прозапальних цитокінів [15, 43, 44].

Сучасними дослідженнями з'ясовано, мононуклеарні фагоцити (макрофаги, що знаходяться у тканинах), відіграють важливу функцію та дуже значимі у процесі фагоцитозу та секреції імуноактивних активних речовин. Вони знаходяться у слизових оболонках та, при низькому та помірному бактеріальному інфікуванні, можуть бути ефективними фагоцитами. Зокрема, це обумовлено великою площиною поверхні, адже це полегшує активний фагоцитоз. Велика площа дає змогу нести багато поверхневих лігандів-рецепторів для покращення процесу фагоцитування. Після контакту з антигеном моноцити (макрофаги) презентують (рис. 1.6) його (передають відомості про структурні особливості антигену до Т-лімфоцитів та стають праймером для розвитку набутої імунної відповіді [37, 41].

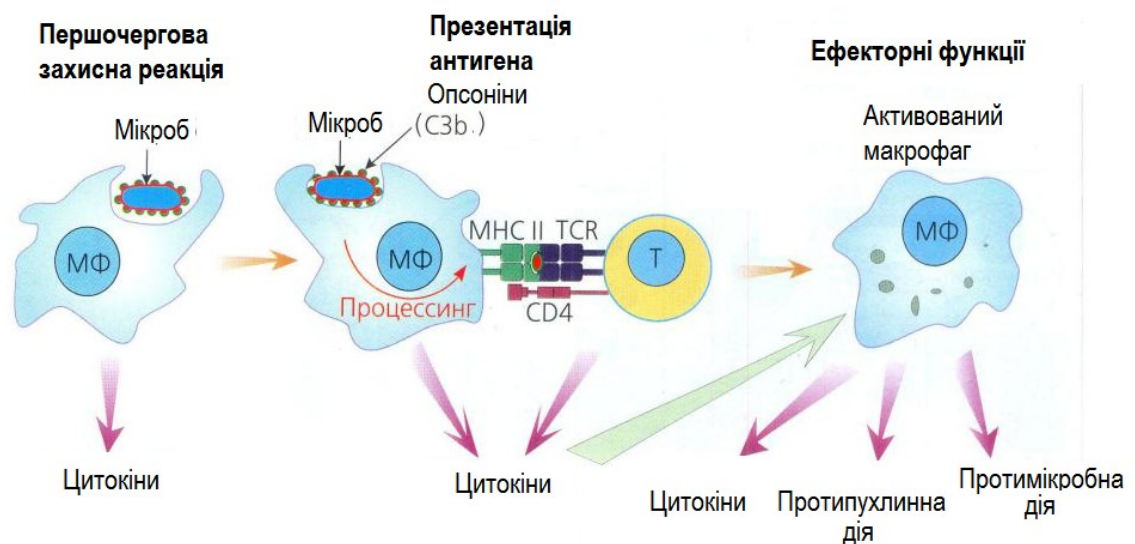


Рис. 1.6. Презентація антигену та активація моноцита-макрофага

На фагоцитарну активність моноцитів чинять вплив різноманітні фактори. Так, хоріонічний гонадотропін активно стимулює фагоцитарну та окислювальну активність моноцитів у жінок. Так, до інтактних

моноцитів він спричиняє пригнічувальну дію (зменшує як фагоцитарну так і окислювальну активність) [10].

Вивчали роль моноцитів у реалізації регуляторного впливу β -ендорфіну та селективних лігандів опіатних рецепторів на проліферативну відповідь лімфоцитів та продукцію IL 4 и IFN γ . Встановлено, що β ендорфін і синтетичні агоністи δ і μ опіатних рецепторів з різним ступенем інтенсивності надавали стимулюючий ефект на вираженість реакції трансформації лімфоцитів в культурах. На тлі блокади опіатних рецепторів ефекти β ендорфіну, не проходили, а навпаки посилювалися. У культурах моноцитів перераховані вище пептиди надавали пригнічуючий ефект на проліферацію, найбільш виражену в разі спільного внесення β ендорфіну і антагоніста опіатних рецепторів [6].

РОЗДІЛ 2.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Схема експериментального дослідження

Дослідження проводилось на кафедрі біології людини та імунології у 2019-2020 та 2020-2021 навчальних роках. Було задіяне кров 12 лабораторних мишей, яку отримували із хвостової артерії загальноприйнятим способом [24]. Усі маніпуляції із тваринами проводились у відповідності до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей (Страсбург, 1985 р). Директиви Ради Європи (1986 р), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження з ними», рішень Першого національного конгресу України з біоетики (2001 р), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (2013).

Ми припустили, що інкубація адреналіну із фагоцитами *in vitro* дає змогу змодельовати певним чином умови активації тих клітин в умовах дії стрес фактора *in vivo*.

Схема дослідження (рис. 2.1).

В якості матеріалу для дослідження використовувалася кров з хвостової артерії мишей. Згідно вимог біоетики за один раз брали не більше 0,5 мл крові. Отриману кров стабілізували кристалічним гепарином (0,2 мг/мл), після чого відбирали масу лейкоцитів стандартним способом: додавали 10% розчин желатину таким чином, щоб його остаточне розведення (остаточна концентрація) складало 1%. Гепаринізовану кров інкубували в пробірці при 37 ° C під кутком 45 ° на протязі пів години. Це потрібно для склеювання еритроцитів. Після седиментації еритроцитів у пробірці верхній шар складається з плазми крові та плаваючих в ній лейкоцитів [13, 14, 19, 20, 22, 25].

Рис. 2.1. Схема дослідження

Заздалегідь у мишей ми визначили вміст лейкоцитів [13, 14, 19, 20, 22, 25]. Отриману масу лейкоцитів, ми розлили в мікропробірки (епендорфи) по 50 мкл і додали відповідні дози препарату «Адреналін» (Дарниця ЧАО (Україна, Київ)).

2.2. Метод дослідження фагоцитарної активності

Даний метод заснований на здатності фагоцитів поглинати і перетравлювати мікроорганізми для оцінки їх функціональної активності. Об'єктом фагоцитозу виступали мікроорганізми *S. Cerevicae* (пекарські дріжджі) (ДСТУ 28483-90) [13, 14, 19, 20, 22, 25].

Підготовка *S. Cerevicae*. 2 г концентрованого сухого порошку *S. Cerevicae* поміщали у 100 мл фізіологічного розчину на одну годину (постійно помішуючи або використовуючи магнітну мішалку), потім завесь мікробів тримали тридцять хвилин на водяній бані при температурі 25⁰С та відфільтровували.

Безпосередньо перед проведенням дослідження фагоцитарної активності, 1 мл мікроорганізмової суспензії три рази промивали

фізіологічним розчином (центрифугування при 1000 об/хв по п'ять хвилин). Потім (приготування робочого розчину) до 0,1 мл осаду доливали 9,9 мл фізіологічного розчину. Кількість мікроорганізмів контролювали за допомогою камери Горяєва.

У приготовлені фагоцити мишей додавали адреналін у трьох концентраціях: 10 мкг/кг (низька концентрація), 100 мкг/кг (середня концентрація) та 200 мкг/кг (висока концентрація). Це робилося для того, щоб змодельовати процес розвитку стрес-реакції та вивчити реакцію моноцитів на слабкий, сильний та середній рівень стресу.

До інкубованої з адреналіном крові мишей додавали суспензію дріжджів та поміщали у термостат на 30 та на 60 хвилин для здійсненні процесу фагоцитоза. Потім робили мазки за загальноприйнятою методикою та фарбували їх за Романовським Гімзою [14] (рис. 2.2).



Рис. 2.2. Готові препарати

Готові препарати досліджувалися під імерсійним об'єктивом. Під час мікроскопії мазка підраховували число фагоцитуючих клітин, проводили розрахунок показників фагоцитозу.

Інтенсивність фагоцитозу визначали цифрами від 1 до 4.

Перший ступінь: поглинуто та фагоцитовано 1 – 4 клітини;
 Другий ступінь: поглинуто та фагоцитовано 5 – 7 клітини;
 Третій ступінь: поглинуто та фагоцитовано 8 – 10 клітин;
 Четвертий ступінь: поглинуто та фагоцитовано більш ніж 10 клітин
 [14].

Для оцінки поглинальної здатності і перетравлювальної функції фагоцитів підраховували по 50 клітин в мазку (рис. 2.3).

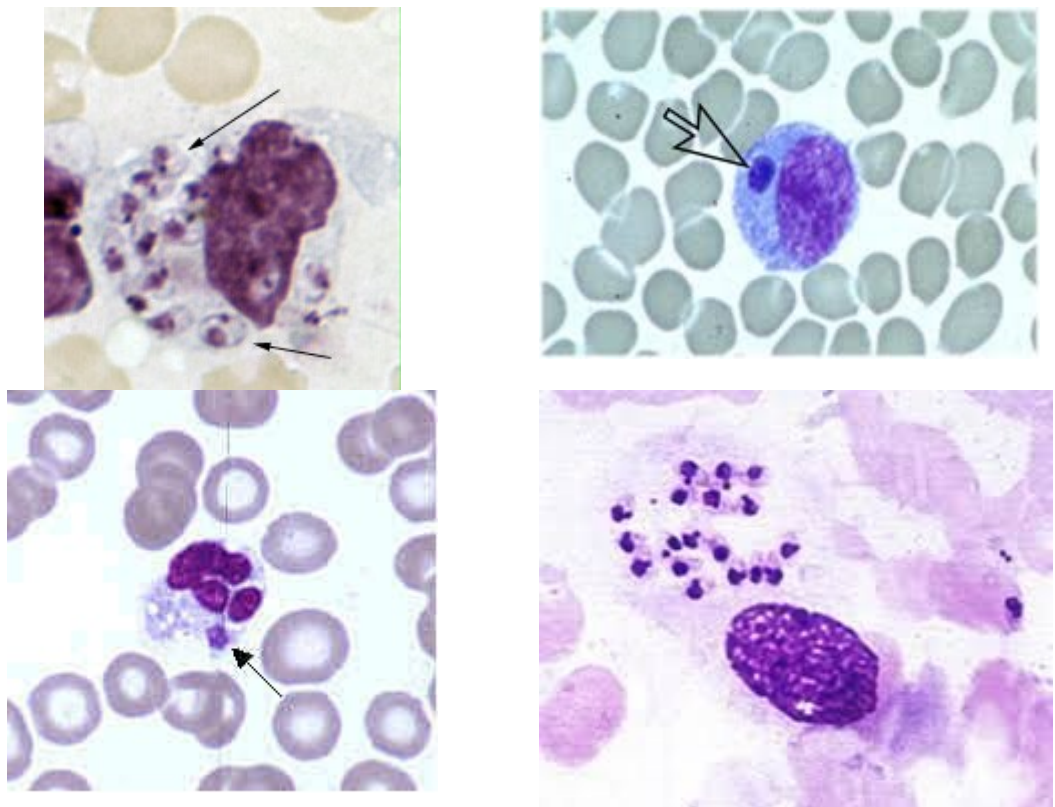


Рис. 2.3. Фагоцити з поглинутими бактеріями

У кожній клітині-фагоциті-моноциті визначали: є чи нема внутрішньоклітинно розташованих бактерій (М), кількість живих бактерій ($M_{\text{жив}}$), кількість лізованих та зруйнованих бактерій ($M_{\text{вб}}$):

$$M = M_{\text{жив}} + M_{\text{вб}} .$$

Фагоциторноактивним вважається моноцит, який поглинув клітини *S. Cerevicae* (ФА).

Поглиналину функцію оцінювали за показниками:

1. Фагоцитарний індекс або відсоток фагоцитозу (ІФ) - відсоток моноцитів, що поглинули *S. Cerevicae* (ФА), із загального числа порахованих моноцитів:

$$I\Phi = \frac{\Phi A}{100}$$

2. Фагоцитарне число (ФЧ) визначення середньої кількості фагоцитованих *S. Cerevicae* (М), що приходить на 1 «активованій» моноцит (ФА):

$$\Phi\mathcal{C} = \frac{M}{\Phi A}$$

3. Коефіцієнт фагоцитарного числа (КФЧ) – показник, який дозволяє оцінити динаміку захоплення клітин *S. Cerevicae* в часі. Обчислюється шляхом поділу ФЧ після 30 хвилин інкубації до показника ФЧ після 120 хвилин інкубації:

$$K\Phi\mathcal{C} = \frac{\Phi\mathcal{C} 30}{N\Phi\mathcal{C} 120}$$

Завершеність фагоцитарного акту оцінювали за показниками:

1. відсоток перетравлення (% П) - відношення числа вбитих *S. Cerevicae* ($M_{вб}$) до загальної кількості фагоцитованих моноцитів (М):

$$\%П = \frac{M_{вб}}{M} \times 100$$

2. індекс перетравлення (ІП) - середнє число убитих *S. Cerevicae* (муб) на 1 порахований моноцит, тобто на $\Phi = 50$:

$$IП = \frac{M_{вб}}{\Phi}$$

3. інтегральний показник перетравлювальної активності ($I_{ппа}$), який дозволяє оцінити фагоцитарну активність моноцитів в абсолютних значеннях (ФАМ_{абс} - фагоцитарна активність абсолютної кількості моноцитів):

$$I_{ппа} = \frac{\Phi A M_{абс} \times \%П}{1000}$$

Примітка: $\Phi_{AM} = \frac{\% \Phi_{AM} \times M_{abc}}{100}$; $M_{abc} = \frac{\% M \times L}{100}$, де L – кількість

лейкоцитів, %M відносна кількість моноцитів [13, 14, 19, 20, 22, 25].

Нормальні величини:

- ФЧ = 9,81 %
- ПІ - 1,16 %;
- I_{ппа} - 66,3 % [14, 22].

РОЗДІЛ 3.

АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

3.1. Показники поглинальної функції моноцитів периферичної крові мишей в умовах дії різних концентрацій адреналіну

3.1.1. Фагоцитарний індекс моноцитів периферичної крові мишей. Було проведене експериментальне дослідження згідно поставлених задач. На початку визначали кількість лейкоцитів у досліджуваних мишей. З'ясовано, їх кількість склала $13,1 \pm 0,2 \cdot 10^9/\text{л}$.

Згідно схеми експериментального дослідження було проведено позначення показників поглинальної функції моноцитів периферичної крові мишей, яка не піддавалася впливу адреналіну.

При визначенні **фагоцитарного індексу** (% ФА), фагоцитарного числа (ФЧ) та коефіцієнт фагоцитарного числа (КФЧ) у крові мишей, яка не піддавалася впливу адреналіну, були отримані наступні показники, які потім порівнювалися із показниками крові, яка знаходилась під впливом адреналіну (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Показники поглинальної функції моноцитів периферичної крові мишей, яка не піддавалася впливу адреналіну

Показники	фагоцитарне число, ФЧ (у.о.)	коефіцієнт фагоцитарного числа (КФЧ) (у.о.)	фагоцитарний індекс ІФ (%)
Контроль	$5,6 \pm 0,2$	$1,16 \pm 0,09$	$96,8 \pm 1,1$

Як можна бачити, миші мають високий відсоток клітин-моноцитів, які здатні до активного фагоцитозу (96.8%). Кожна фагоцитуюча клітина здатна поглинути в середньому 5,4 бактеріальні клітини (у нашому випадку, *S. Cerevicae*), у активних фагоцитів таке поглинання складає 5,6

бактеріальних клітин. В цілому такі дані співпадають із нормальними величинами [14, 19, 18, 24].

Ми провели експериментальне визначення стійкості до стресового впливу моноцитів крові мишей. Для цього кров інкубували із адреналіном у низькій середній та високій концентраціях. Ми вважали, що це може бути моделлю слабого, середнього та сильного стресового впливу.

Показники індексу фагоцитозу, який показує відсоток активних фагоцитів із числа досліджених фагоцитів, представлено на рис. 3.1.

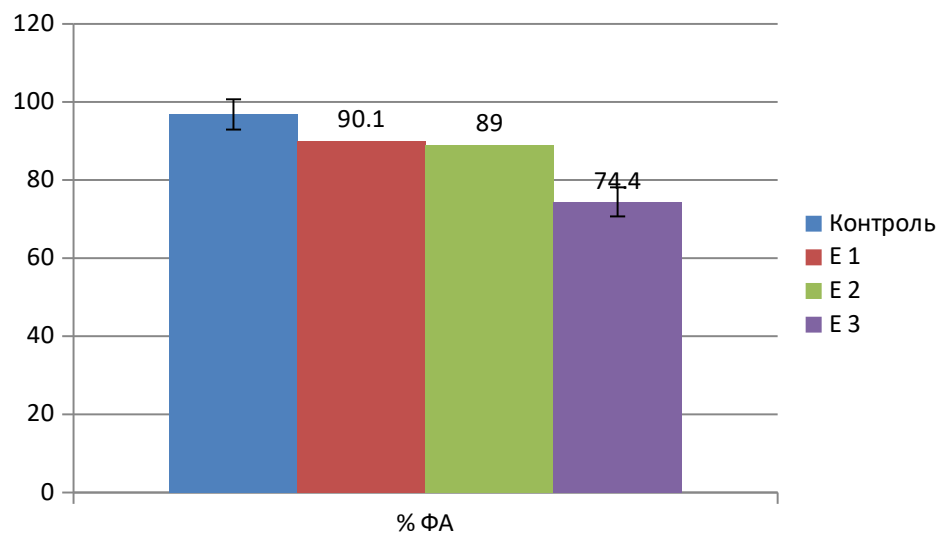


Рис. 3.1. Показники індексу фагоцитозу у контролі та експерименті

Примітка: E1 – концентрація адреналіну 10 мкг/кг; E2 – концентрація адреналіну 100 мкг/кг; E3 – концентрація адреналіну 200 мкг/кг; * відмінності між контролем та експериментом; @- відмінності між E1 та E2; # - відмінності між E1 та E3; & - відмінності між E2 та E3. $p \leq 0,05$

Як можна бачити, адреналін є фактором, який достовірно знижує кількість активних фагоцитів у порівнянні з контролем. Причому, ІФ у групі із слабкою концентрацією адреналіну знизився на 7% (відповідно, з $96,8 \pm 1,1$ до $90,1 \pm 1,1$). ІФ у групі із середньою концентрацією

адреналіну знизився на 8% (відповідно, з $96,8 \pm 1,1$ до $89 \pm 0,9$). ІФ у групі із високою концентрацією адреналіну знизився на 23,1% (відповідно, з $96,8 \pm 1,1$ до $74,4 \pm 1,3$) (рис. 3.2). Додамо, що всі ці зміни були статистично достовірними.

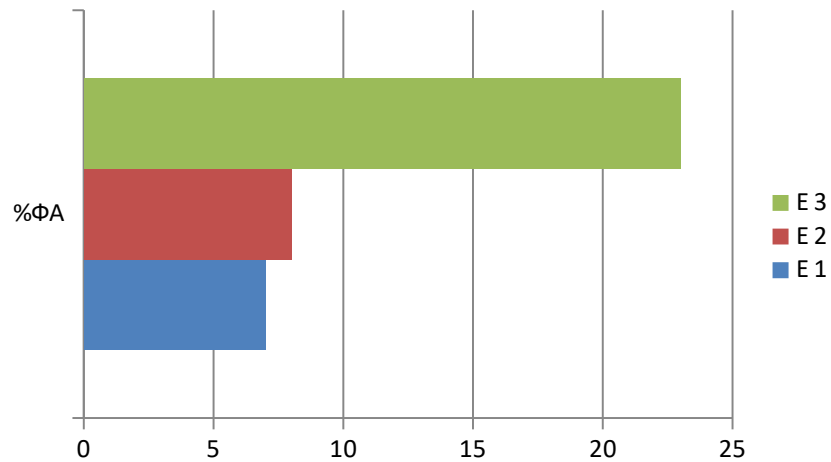


Рис. 3.2. Зміни вмісту активних фагоцитів в залежності від концентрації адреналіну

Примітка: E1 – концентрація адреналіну 10 мкг/кг; E2 – концентрація адреналіну 100 мкг/кг; E3 – концентрація адреналіну 200 мкг/кг

Ми, також, порівняли зміни кількості активних моноцитів-фагоцитів в залежності від кількості адреналіну. З'ясовано, що статистично достовірних відмінностей між показниками в групі з низьким та середнім вмістом адреналіну не було зафіксовано (відповідно, $90,1 \pm 1,5$ та $89 \pm 0,9$). Натомість, висока концентрація адреналіну, вочевидь пригнічує активність моноцитів периферичної крові. Так, зменшення ІФ при порівнянні групи із низьким та високим вмістом адреналіну склало 17,4 %, а при порівнянні групи з середньою концентрацією адреналіну та високою концентрацією адреналіну – 16,4%.

Таким чином, інкубація живих моноцитів з адреналіном протягом 30 хвилин достовірно зменшує відсоток фагоцитуючих клітин у

досліджуваних зразках. Така зміна має дозо залежний характер: низька та середня концентрації адреналіну зменшує кількість активно фагоцитуючих клітин не так сильно як висока концентрація.

Ми припускаємо, що подібні результати пояснюються наявністю на поверхні моноцитів β -адренорецепторів, які можливо, стаючи «зайнятими» адреналіном, заважають розпізнавати комплекси гістосумісності на поверхні бактеріальних клітин, або активізують певні внутрішньоклітинні процеси. Це припущення підтверджується результатами досліджень, які свідчать, що надлишкова активізація фагоцитозу (як моноцитарного так і нейтрофільного) відбувається при блокаді β -адренорецепторів. Коли ж ці рецептори розблоковують, активність фагоцитозу знижується [18, 33, 39, 40].

3.1.2. Показник фагоцитарного числа моноцитів периферичної крові мишей. Сама по собі кількість фагоцитів не в повній мірі характеризує стан фагоцитарної активності. Важливо з'ясувати наскільки активно вони захоплюють бактеріальні часточки. Для цього ми визначили **показник фагоцитарного числа**, яке показує середню кількість фагоцитованих клітин *S. Cerevicae* одним активним фагоцитом-моноцитом.

У контрольній групі цей показник склав $5,6 \pm 0,2$, що означає, що в середньому один моноцит захватує 5 клітин *S. Cerevicae*.

Ми, також, визначили відсоткове співвідношення моноцитів з різною інтенсивністю фагоцитозу (рис. 3.3). Найчисельнішою є група моноцитів, які здатні захопити 5-7 бактеріальних клітин. Можливо, що саме ця кількість є оптимальною для фагоцитозу в звичайних умовах. Досить великою є кількість клітин, де спостерігалось захоплення 6-9 клітин, хоча переважно ми спостерігали по 6 клітин у фагоциті. Майже 20 відсотків фагоцитів мали 1-2 фагоцитовані клітини, що вказує на їх низьку поглинальну здатність. Вісім відсотків клітин могли поглинути

більше 10 клітин. Такий розподіл, вочевидь, має підготувати організм до зустрічі з різними типами збудників для адекватної імунної реакції.

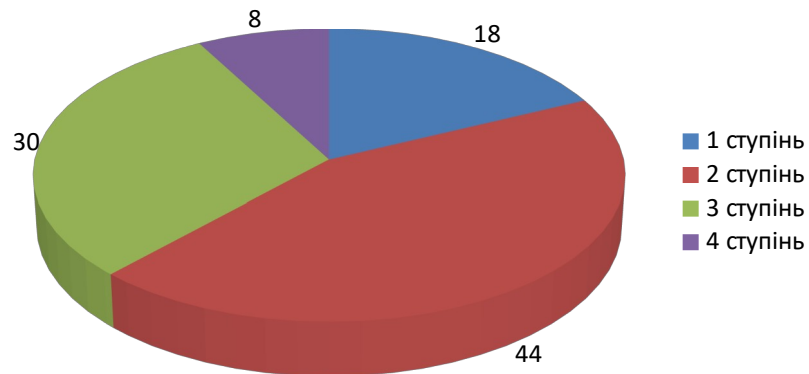


Рис. 3.3. Відсоткове співвідношення клітин з різною інтенсивністю фагоцитозу у контрольних зразках

Примітка: 1 ступінь: поглинуто та фагоцитовано 1 – 4 клітини; 2 ступінь - 5 – 7 клітин; 3 ступінь - 8 – 10 клітин; 4 ступінь - фагоцитовано більш ніж 10 клітин

Показники фагоцитарного числа ми визначили і у зразках крові, які інкубувалися із адреналіном (рис. 3.4). Отже, адреналін достовірно впливає на фагоцитарне число, тобто змінює характер захоплення бактеріальних клітин моноцитами у порівнянні з контролем. Причому, ФЧ у групі із слабкою концентрацією адреналіну несподівано зросло до 132 % у порівнянні із контролем (відповідно, з $5,6 \pm 0,2$ до $7,4 \pm 0,5$). Фагоцитарне число у групі із середньою концентрацією адреналіну практично не знизилося, точніше, зменшення було лише 9% (відповідно, з $5,6 \pm 0,2$ до $5,1 \pm 0,3$). Показники ж фагоцитарного числа у групі із високою концентрацією адреналіну знизилися набагато більше, а саме на 31,6% (відповідно, з $5,6 \pm 0,2$ до $3,9 \pm 0,3$) (див. рис. 3.4). Додамо, що всі ці зміни були статистично достовірними.

Ми, також, визначили відсоткове співвідношення моноцитів з різною інтенсивністю фагоцитозу (рис. 3.3). Для цього кожену проглянуту клітину ми відносили до однієї з чотирьох ступенів шкали інтенсивності фагоцитозу (рис. 3.5).

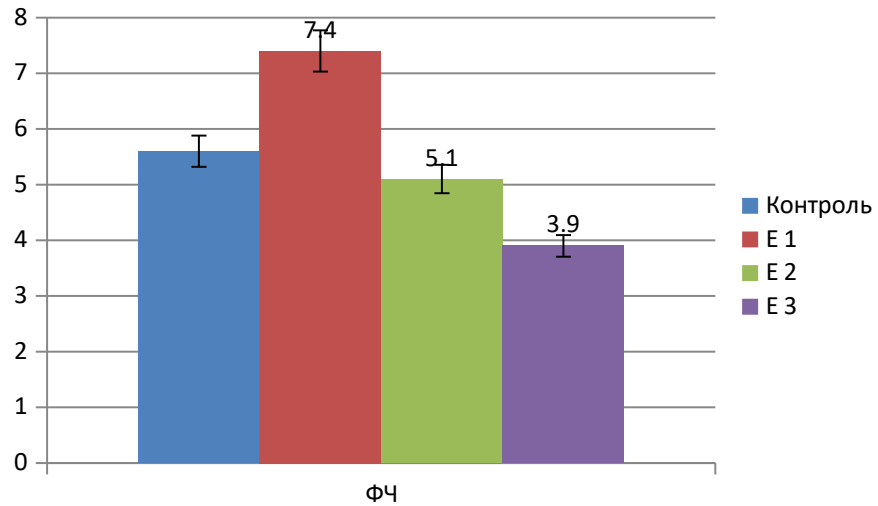


Рис. 3.4. Показники фагоцитарного числа у контролі та експерименті

Примітка: E1 – концентрація адреналіну 10 мкг/кг; E2 – концентрація адреналіну 100 мкг/кг; E3 – концентрація адреналіну 200 мкг/кг; * відмінності між контролем та експериментом; @- відмінності між E1 та E2; # - відмінності між E1 та E3; & - відмінності між E2 та E3. $p \leq 0,05$

Було з'ясовано, що кількість моноцитів, які захватували 1-4 бактеріальні клітини стала меншою в зразках із середньою концентрацією адреналіну, а у зразках із високою концентрацією стала значно більшою (відповідно, 20%, 16 %, 41%). 2 степінь інтенсивності фагоцитозу показали 22% клітин у зразках із низькою концентрацією адреналіну, 46% моноцитів мали 5-7 поглинутих бактерій у зразках із середньою концентрацією адреналіну, а у зразках із високою концентрацією - 36% клітин. Третій ступінь інтенсивності фагоцитозу мали 51% моноцитів у зразках, що мали вплив низьких доз адреналіну, 30% моноцитів у зразках із середніми дозами адреналіну та 18 % моноцитів мали здатність поглинути більш ніж 10 бактеріальних клітин у зразках із високою концентрацією адреналіну.

З'ясовано, що додавання адреналіну у мінімальній концентрації робить процес фагоцитозу більш інтенсивним, середні дози мають

незначний вплив на цей процес, а високі дози адреналіну зменшують інтенсивність процесу фагоцитозу.

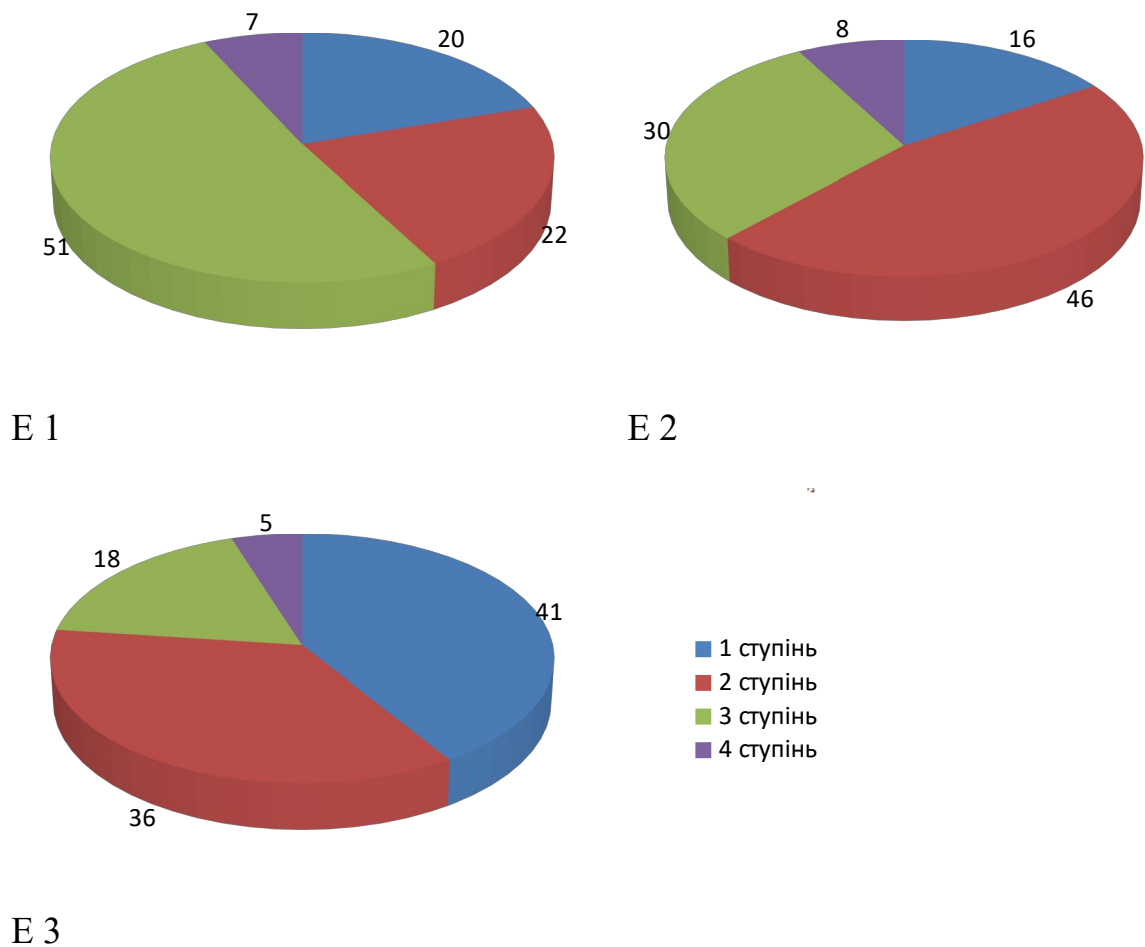


Рис. 3.5. Відсоткове співвідношення клітин з різною інтенсивністю фагоцитозу у експериментальних зразках

Примітка: Е1 – концентрація адреналіну 10 мкг/кг; Е2 – концентрація адреналіну 100 мкг/кг; Е3 – концентрація адреналіну 200 мкг/кг; 1 ступінь: поглинуто та фагоцитовано 1 – 4 клітини; 2 ступінь - 5 – 7 клітин; 3 ступінь - 8 – 10 клітин; 4 ступінь - фагоцитовано більш ніж 10 клітин

Імовірною причиною такого явища може бути вплив адреналіну на поверхневі рецептори моноцитів та, що теж можливо, на рецептори клітин-об'єктів фагоцитозу. Але дане припущення потребує подальшого вивчення.

3.1.3. Коефіцієнт фагоцитарного числа моноцитів периферичної

крові мишей. Скласти уявлення про потенціал фагоцитозу для певної групи клітин (у нашому випадку моноцитів) допомагає **коефіцієнт фагоцитарного числа (КФЧ).** Він показує динаміку розвитку процесу фагоцитозу в часі. Для цього досліджувани зразки оставляли в термостаті на 30 хвилин, потім робили мазок та фарбували його для оцінки показників фагоцитозу, а пробірку відправляли до термостату ще на 90 хвилин і після цього терміну також робили мазки та з'ясовували активність фагоцитозу. Ми розраховували коефіцієнт фагоцитарного числа для досліджуваних препаратів.

Фагоцитарне число для зразків з різними строками інкубації було визначене, а результати представлені у таблиці 3.2 та на рисунку 3.6.

Таблиця 3.2

Показники фагоцитарного числа для моноцитів з різним строком інкубації

Показники	Контроль	Експериментальні групи		
		Е 1. 10 мкг/кг	Е 2. 100 мкг/кг	Е 3. 200 мкг/кг
Інкубація 30 хвилин	$5,6 \pm 0,02$	$3,9 \pm 0,3$	$5,1 \pm 0,3$	$7,4 \pm 0,5$
Інкубація 120 хвилин	$4,8 \pm 0,03$	$3,5 \pm 0,09$	$4,9 \pm 0,05$	$4,6 \pm 0,3$
Коефіцієнт фагоцитарного числа (КФЧ) (у.о.)	$1,16 \pm 0,9$	$1,11 \pm 0,7$	$1,04 \pm 0,6$	$1,61 \pm 0,8$

Як можна бачити із таблиці та рисунку, більш тривала інкубація не привела до збільшення поглинальної здатності моноцитів. Але цікавим виявився факт вирівнювання фагоцитарного числа практично в усіх зразках (контроль, середні дози адреналіну, високі дози адреналіну) за винятком зразку, де моноцити знаходились під впливом низької дози адреналіну. У контрольній групі середня кількість поглинутих клітин достовірно знизилась від 5,6 до 4,8. У зразках із низькою концентрацією адреналіну середня кількість поглинутих клітин знизилась від 3,9 до 3,5, але ця різниця не є статистично достовірною. У зразках із середньою концентрацією адреналіну кількість поглинутих клітин практично не

змінилася (відповідно, 5.1 та 4.9), але ця різниця не є статистично достовірною. У зразках із високою концентрацією адреналіну середня кількість поглинутих клітин різко знизилась від 7.4 до 4.6, різниця є статистично достовірною.

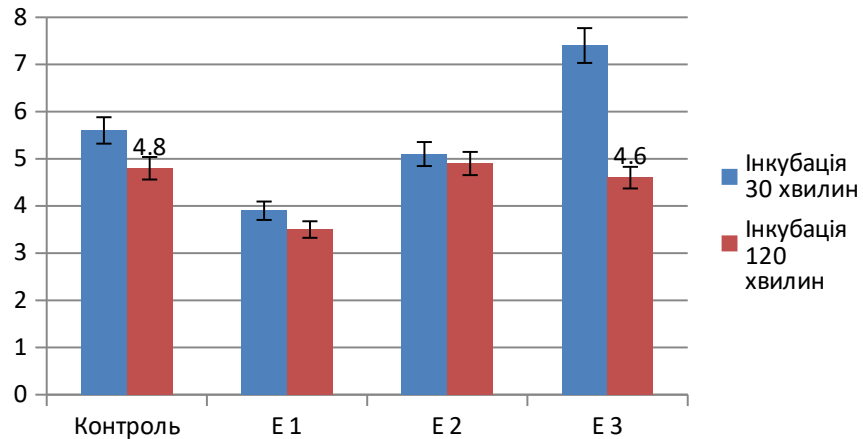


Рис. 3.6. Порівняння поглинальної здатності моноцитів в залежності від часу інкубації

* відмінності між зразками, що інкубувалися 30 хвилин та 120 хвилин, $p \leq 0,05$

Тож, можна казати про стимулюючий вплив великих концентрацій адреналіну на поглинальну здатність окремих моноцитів. Але така стимуляція не є тривалою і вже через годину показники зменшуються практично до показників контролю. Низькі концентрації адреналіну не дають покращення поглинальної здатності окремих клітин, але і не мають відтермінованого депресивного ефекту.

Використовуючи наявні показники фагоцитарного числа у досліджуваних зразках, ми розраховали коефіцієнт фагоцитарного числа (рис. 3.7). З'ясовано, що для контрольної групи цей показник (КФЧ) склав $1,16 \pm 0,9$ у.о. Не відрізнялися статистично від контролю показники КФЧ для зразків із низьким та середнім вмістом адреналіну (відповідно, 1,16 у.о. та 1.11 у.о.; 1.16 у.о. та 1.04 у.о). Лише висока концентрація адреналіну достовірно збільшила КФЧ до 1,61 у.о.

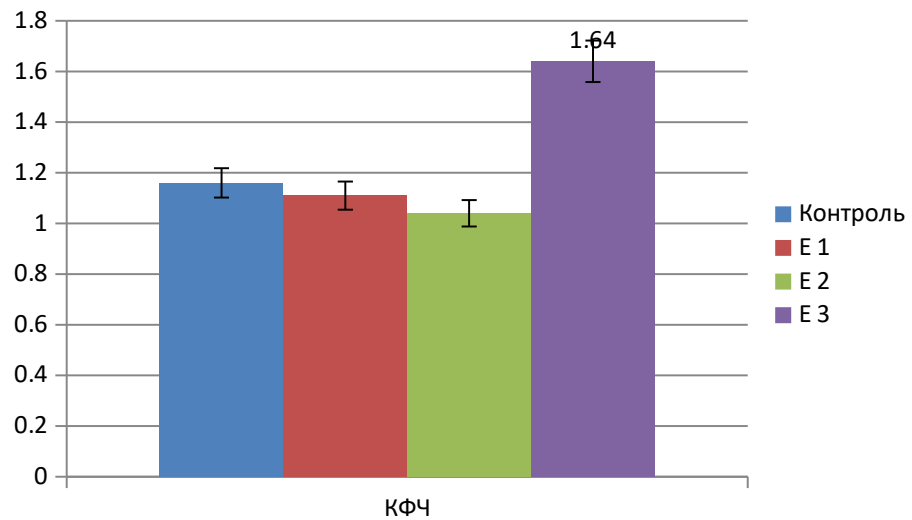


Рис. 3.7. Показники коефіцієнту фагоцитарного числа у контролі та експерименті, у.о.

Примітка: E1 – концентрація адреналіну 10 мкг/кг; E2 – концентрація адреналіну 100 мкг/кг; E3 – концентрація адреналіну 200 мкг/кг; * відмінності між контролем та експериментом; @- відмінності між E1 та E2; # - відмінності між E1 та E3; & - відмінності між E2 та E3. $p \leq 0,05$

Можливо, що чим тривалішим є час інкубації, тим більшою є витрата ресурсів фагоцита, а поглинальна здатність навпаки стає меншою. Дане припущення вимагає подальших досліджень, адже результати є суперечливими.

Узагальнення показників поглинальної здатності моноцитів ми зробили у таблиці 3.3.

Таблиця 3.3

Показники поглинальної здатності моноцитів периферичної крові мишей в умовах дії різних концентрацій адреналіну

Групи	Контрольна група	Експериментальні групи		
		Е 1. 10 мкг/кг	Е 2. 100 мкг/кг	Е 3. 200 мкг/кг
Показники				
1	2	3	4	5
Індекс фагоцитозу, ІФ	$96,8 \pm 0,6$	$74,4 \pm 1,3$	$89 \pm 0,9$	$90,1 \pm 0,5$

Продовження таблиці 3.3

1	2	3	4	5
фагоцитарне число, ФЧ	$5,6 \pm 0,2$	$3,9 \pm 0,3$	$5,1 \pm 0,3$	$7,4 \pm 0,5$
коефіцієнт фагоцитарного числа (КФЧ) (у.о.)	$1,16 \pm 0,9$	$1,11 \pm 0,7$	$1,04 \pm 0,6$	$1,61 \pm 0,8$

Поглиналина здатність залежить від концентрації адреналіну. Причому, низькі концентрації і цілому погіршують поглинальну здатність, а високі концентрації короткострокова покращують показники поглинальної здатності фагоцитів.

3.2. Показники завершеності фагоцитарного акту моноцитів периферичної крові мишей в умовах дії різних концентрацій адреналіну

Не всі показники, що відображають фагоцитарну функцію є однаково інформативними. За літературними даними найбільш вагомими для оцінки якості фагоцитарної активності можна назвати наступні: індекс поглинання (фагоцитарне число); коефіцієнт фагоцитарного числа – вони є відображенням закінченості фагоцитозу та індекс бактерицидності (відсоток перетравлення) - як здатність фагоцита не тільки захопити, але і лізувати захоплений мікроорганізм [14, 19]. Відомо, що остаточною метою фагоцитозу є повне знищення захопленого мікроорганізму (біохімічний лізінг фагосомального вмісту) [19, 41]. Коли процес фагоцитозу не завершено, мікроорганізми можуть почати розмножуватися всередині фагоцита та, зрештою, зруйнувати його [19].

Ми провели вивчення показників завершеності фагоцитарного акту

моноцитів периферичної крові мишей в умовах дії різних концентрацій адреналіну.

Для визначення показника бактерицидності (відсотка перетравлення) ми визначали кількість розщеплених мікроорганізмів в середині фагоцита до загальної кількості захоплених клітин. Результати наведено у таблиці 3.4 та на рис. 3.8.

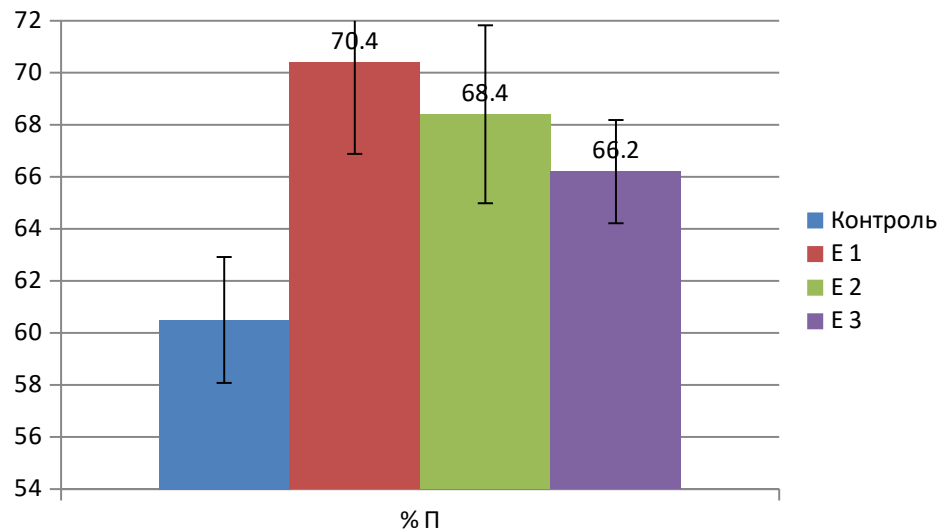


Рис. 3.8. Показники відсотка перетравлення (індекс бактерицидності) моноцитів мишей в умовах впливу адреналіну та у контролі

Примітка: E1 – концентрація адреналіну 10 мкг/кг; E2 – концентрація адреналіну 100 мкг/кг; E3 – концентрація адреналіну 200 мкг/кг; * відмінності між контролем та експериментом; @- відмінності між E1 та E2; # - відмінності між E1 та E3; & - відмінності між E2 та E3. $p \leq 0,05$

У моноцитів периферичної крові мишей, які не зазнали впливу адреналіну індекс перетравлення дорівнював 60,5 %. Це означає, що 39,5 відсотків фагоцитованих дріжджів не було лізовано. Ці клітини залишилися ізольованими, але потенційно загрозливими. Але, згідно літературних даних, такий рівень бактерицидності є нормальним [14, 19, 18, 24].

Було проведено експериментальне дослідження стресовитривалості моноцитів крові мишей. Кров поміщали у пробірки та витримували у термостаті, додавши адреналін у низькій (10 мкг/кг), середній (100 мкг/кг) та високій (200 мкг/кг) концентраціях. Ми припустили, що така модель може допомогти зрозуміти вплив слабого, середнього та сильного стресового впливу.

Як можна бачити, усі зразки показали вищий рівень бактерицидності ніж контроль. Тож, адреналін є фактором, який достовірно покращує перетравлення фагоцитованих часточок. Причому, %П у групі із слабкою концентрацією адреналіну збільшився на 22,3% (відповідно, з $60,5 \pm 2,2$ до $70,4 \pm 1,7$ %). %П у групі із середньою концентрацією адреналіну підвищився на 13 % (відповідно, з $60,5 \pm 2,2$ до $68,4 \pm 1,9$ %). %П у групі із високою концентрацією адреналіну став більше на 9,4 % (відповідно, з $60,5 \pm 2,2$ до $66,2 \pm 0,9$ %) (рис. 3.9). Додамо, що всі ці зміни були статистично достовірними.

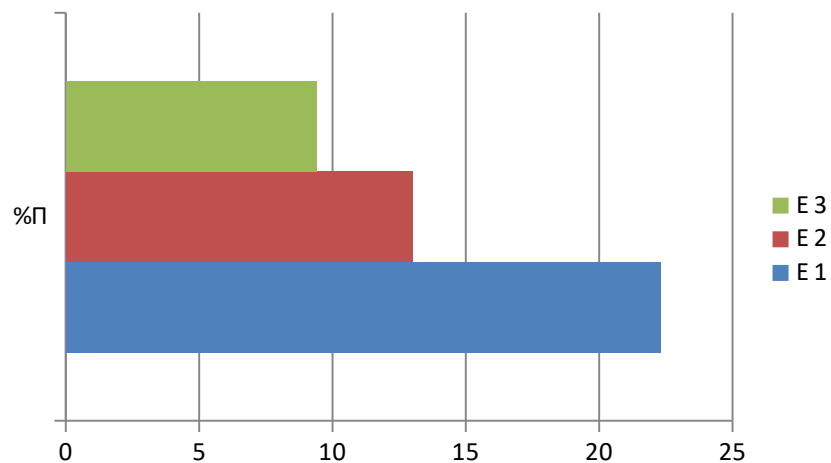


Рис. 3.9. Зміни індексу бактерицидності в залежності від концентрації адреналіну

Примітка: E1 – концентрація адреналіну 10 мкг/кг; E2 – концентрація адреналіну 100 мкг/кг; E3 – концентрація адреналіну 200 мкг/кг

Таким чином, інкубація живих моноцитів з адреналіном протягом 30 хвилин достовірно збільшує відсоток фагоцитованих дріжджових клітин у досліджуваних зразках. Така зміна залежить від дози адреналіну: низька та середня концентрації адреналіну покращують якість фагоцитозу не так сильно як низька концентрація.

Ми припускаємо, що адреналін впливає на один з двох механізмів руйнації захоплених часточок у гранулах лізосом фагоцита. Перший – це процес не залежний від наявності кисню (відбувається за участі гідролітичних ферментів (білки катіонні, протеїнази, лізоцим, лактоферин). Другий процес залежить від наявності кисню (відбувається за рахунок мієлопероксидази) [17, 18, 31, 41]. Вочевидь, що збільшення бактерицидності є компенсаторною реакцією на зменшення поглинальної здатності моноцитів в умовах дії адреналіну.

Враховуючи, що не всі моноцити є активними, ми розрахували **індекс перетравлення (ІП)**, тобто середню кількість вбитих дріжджових клітин, яка припадає на один моноцит (рис.3.10).

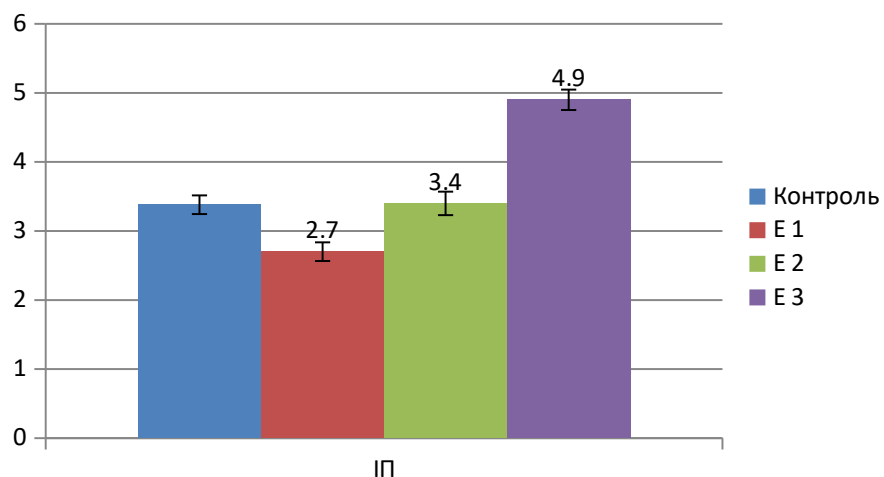


Рис. 3.10. Показники індексу перетравлення моноцитів мишей в умовах впливу адреналіну та у контролі

E1 – концентрація адреналіну 10 мкг/кг; E2 – концентрація адреналіну 100 мкг/кг; E3 – концентрація адреналіну 200 мкг/кг; * відмінності між контролем та експериментом; @- відмінності між E1 та E2; # - відмінності між E1 та E3; & - відмінності між E2 та E3. $p \leq 0,05$

Показники індексу перетравлення у досліджуваних зразках мали залежність від концентрації адреналіну та достовірно відрізнялися від показників контролю. Зауважимо, що відмінності мали статистично достовірний характер і у зразках, які піддавалися впливу адреналіну.

Узагальнені показники завершеності фагоцитарного акту показано у таблиці 3.4.

Таблиця 3.4

Показники завершеності фагоцитарного акту моноцитів периферичної крові мишей в умовах дії різних концентрацій адреналіну

Групи	Контрольна група	Експериментальні групи		
		Е 1. 10 мкг/кг	Е 2. 100 мкг/кг	Е 3. 200 мкг/кг
Показники				
Відсоток перетравлення, %П	60,5 ± 2,2	70,4 ± 1,7	68,4 ± 1,9	66,2±0,9
індекс перетравлення, П, %	3,38± 0,1	2,7 ± 0,4	3,4 ± 0,8	4,9 ± 0,6

Тож, фагоцитарна активність є показником, який тонко реагує на стрес та може бути використано в якості маркера інтенсивності стрес-реакції.

ВИСНОВКИ

1. З'ясовано, що показники поглинальної функції моноцитів периферичної крові мишей в умовах дії різних концентрацій адреналіну мають відмінності у порівнянні із контролем. Таким чином, вплив адреналіну на моноцити протягом 30 хвилин достовірно зменшує відсоток фагоцитуючих клітин. Низька та середня концентрації адреналіну зменшує кількість активно фагоцитуючих клітин менше ніж висока концентрація. Зафіксовано модифікації характеру захоплення бактеріальних клітин моноцитами у порівнянні з контролем.
2. Показники завершеності фагоцитарного акту моноцитів периферичної крові мишей мають відмінності в залежності від дії різних концентрацій адреналіну. Адреналін достовірно збільшує відсоток зруйнованих дріжджових клітин у досліджуваних моноцитах. Інтенсивність процесу залежить від концентрації адреналіну: низька та середня покращують процеси розщеплення фагоцитованих клітин в меншому ступені ніж висока.
3. Зафіксовано стимулюючий вплив великих концентрацій адреналіну на поглинальну здатність окремих моноцитів. Але така стимуляція не є коротривалою. Низькі і середні концентрації адреналіну не покращують активності фагоцитозу окремих клітин, але і не мають вираженого депресивного ефекту.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ахмадиев Г.М., Смирнова Н.Н., Шарафутдинов Р.Н. Изучение влияния 0,1%-го раствора адреналина гидрохлорида на резистентность лейкоцитов крови ягнят. *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*. 2017;47(3):49-54. URL: <https://sibvest.elpub.ru/jour/article/view/378/377>
2. Бесчасний С.П. Стресорний вплив вродженої сенсоневральної туговухості на імунну систему дітей 7–11 років. *Фізіологічний журнал*. 2013. Т. 59. № 1. С.110-116. URL: https://fz.kiev.ua/journals/2013_V.59/2013_1/110-116.pdf
3. Брошков М.М. Динамика показателей клеточного и гуморального иммунитета у щенков в зависимости от степени стрессированности организма. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького*. 2014. №3-2. С.41-46. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/dinamika-pokazateley-kletochnogo-i-gumoralnogo-immuniteta-u-schenkov-v-zavisimosti-ot-stepeni-stressirovanosti-organizma>
4. Воронина Н.П. Функциональная активность разных классов макрофагов при стрессе. // Моделирование и клиническая характеристика фагоцитарных реакций: Респ. сб. науч. трудов. Горький, 1989. С.15-21.
5. Гаєвська В.Ю., Гаєвський В.Ю., Ковалишин О.А. Фагоцитарна активність нейтрофілів і моноцитів у хворих на системну склеродермію за умов ушкодження легень. *Фізіол. журн.*, 2017, Т. 63, № 2. С. 80-85. URL: https://fz.kiev.ua/journals/2017_V.63/2017_2/2-2017-80-85.pdf
6. Гейн С.В., Баева Т.А., Черешнев В.А. Роль моноцитов в опиа́тэргической регуляции процессов пролиферации лимфоцитов и

- цитокинового синтеза. *Медицинская Иммунология* 2005, Т. 7, №2-3. С. 110-111.
7. Гольдберг Е.Д. Роль вегетативной нервной системы в регуляции гемопоэза Томск: Изд-во Томского университета, 1997. 218 с.
 8. Горизонтов П.Д., Белоусова О.И., Федотова М.И. Стресс и система крови. – М.: Медицина, 1983. 824 с.
 9. Девойно Л.В. Серотонин-, дофамин- и ГАМК - ергические системы мозга в нейроиммуномодуляции. СПб. : Наука, 1993. – С. 201–242.
 - 10.Заморина С.А., Ширшев С.В. Влияние хорионического гонадотропина на окислительную и фагоцитарную активность моноцитов периферической крови женщин. *Медицинская Иммунология* 2005, Т. 7, №2-3. С. 112-113.
 11. Єлисеєва І. В., Ждамарова Л. А., Білозерський В. І., Колпак С. А. Вивчення динаміки фагоцитарної активності нейтрофілів після повторних щеплень лабораторних тварин експериментальним дифтерійним бактеріальним антигенним препаратом. *УЖМБС*. 2020, 5(1): 50–55 URL: <https://doi.org/10.26693/jmbs05.01.050>
 - 12.Зайцева Н.В. Иммунная и нейроэндокринная регуляция в условиях воздействия химических факторов различного генеза : монография. Пермь : Изд-во Перм. нац. исслед. политехн. ун-та, 2016. – 236 с.
 - 13.Клиническая лабораторная диагностика: методы исследования: Учеб. пособие для студентов спец. «Фармация», «Клиническая фармация», «Лабораторная диагностика» вузов / И.А. Зупанец, С.В. Мисюрева, В.В. Прописнова и др.; Под ред. И.А. Зупанца. 3-е изд., перераб. и доп. Харьков: Изд-во НФаУ: Золотые страницы, 2005. 200 с.
 - 14.Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство в 2 т. / под ред. С.С. Долгова, В.О. Меньшикова. М.: ГЕОТАР-Медіа, 2012. 928 с.

15. Коленчукова О.А., Сарматова Н.И., Мошев А.В. Функциональная активность моноцитов крови в ответ на метициллинрезистентные штаммы *Staphylococcus aureus*. *Инфекция и иммунитет*. 2020 .10(3). С. 551-557. URL: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-РАО-1181>
16. Красных М.С. Влияние экзогенного тироксина на различные типы иммунных реакций : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 14.00.36 . Челябинск. 2004. 23 с.
17. Кузнецова Е.И., Чепелева М.В., Камшилов Б.В. Показатели фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови у больных с развившейся нестабильностью эндопротеза в отдаленные сроки после имплантации крупных суставов. *Гений ортопедии*. 2011. № 4. С. 82-84.
18. Кузьменко О.В., Никифорова Н.А., Иваненко М.О. Фагоцитарна активність нейтрофілів периферичної крові щурів з різною реакцією на стрес. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія*. 2010. Вип. 11. №905. С. 173-177.
19. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Меньшиков В. В., Делекторская Л. Н., Золотницкая Р. П. и др.; Под ред. В. В. Меньшикова.— М.: Медицина. 1987. 368 с.
20. Лабораторный практикум по иммунологии для студентов 3-го курса Л12 факультета экологической медицины МГЭУ им. А. Д. Сахарова // Т. Р. Романовская [др.]. – Минск : МГЭУ им. А.Д. Сахарова, 2006. 58 с.
21. Маррак Ф., Каплер Дж. Т-клетка и ее рецепторы *В мире науки*. 1986. № 4. С. 24-28.
22. Методы комплексной оценки функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов в норме и патологии / Нестерова Н.В., Чудилова Н.А.. Краснодар. Изд-во Кубанского государственного медицинского университета. 2017. 59 с.

23. Милорадов М.Ю., Узикова Е.В., Булаева С.В. Взаимодействие клеток крови: феномены и молекулярная сигнализация // Ярославский педагогический вестник. 2012. №4. С. 165-171. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=18895087>
24. 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.
25. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. М. "Медицина". 2005. 543 с.
26. Полетаева А. В., Леванюк А. И., Сергеева Е. В. Влияние гормонов на иммунологическую реактивность. Обзор. *Экология человека* 2009. 07. С. 42-46. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-gormonov-na-immunologicheskuyu-reaktivnost-obzor>
27. Половцева Т.В. Понятие о структуре и функции иммунной системы. *Гематология и трансфузиология*. 1993. №4. С.9-11.
28. Прохоренко И.О., Германова В.Н., Сергеев О.С. Стресс и состояние иммунной системы в норме и патологии. Краткий обзор литературы // *Вестник медицинского института «Реавиз»: реабилитация, врач и здоровье*. 2017. №1 (25). URL: <https://readera.org/stress-i-sostojanie-immunnoj-sistemy-v-norme-i-patologii-kratkij-obzor-14344262>
29. Репина В.П. Влияние различных концентраций катехоламинов на функционирование иммунокомпетентных клеток // *Экология человека*. 2008. №2. С.30-33. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=12947017>
30. Савина А.С. Участие холинэргических факторов в процессе кроветворения. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 1980. № 6. С.50-52.
31. Савченко А.А., Гвоздев И.И., Борисов А.Г., Черданцев Д.В. Особенности фагоцитарной активности и состояния респираторного взрыва нейтрофилов крови у больных распространенным гнойным

- перитонитом в динамике послеоперационного периода. *Инфекция и иммунитет*. 2017. 7(1). С.51-60. URL: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2017-1-51-60>
32. Соцька Я.А. Вплив комбінації лаферобіону та субаліну на фагоцитарну активність моноцитів у хворих на хронічний вірусний гепатит с низького ступеня активності. *Український медичний альманах*, 2010, Том 13, № 6. С. 143-146. URL: <https://subalin.com.ua/wp-content/uploads/2017/11/Socka.pdf>
33. Улитко М.В. Роль моноцитов-макрофагов в адаптивных реакциях кроветворной ткани при действии на организм экстремальных факторов : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.13 Физиология. Е., 2008. 22 с.
34. Фролов О. К. Вплив біологічно активних речовин медичної п'явки на ізольовані зразки крові під час гірудотерапії. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2010. № 3. С. 36-41. URL: <file:///C:/Users/Кусик/Downloads/immunnye-pokazateli-perifericheskoy-krovi-bolnyh-s-hronicheskoy-patologией-v-protssesse-girudoterapii.pdf>
35. Фёдорова О.В., Краюшкина Н.Г., Шефер Е.Г., Фокина Е. Н., Дегтярь Ю. В., Демидович И. Л. Постстрессовая модуляция органов иммуногенеза. *Вестник ВолГМУ*. 2010. №3 (35). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/poststressovaya-modulyatsiya-organov-immunogeneza>
36. Хлусов И.А., Дыгай А.М., Гольдберг Е.Д. Адренергическая регуляция продукции интерлейкинов клетками костного мозга в условиях иммобилизационного стресса. *Бюлл. эксперим. биологии и медицины*. 1993. Т.116, № 12. С.570-572.
37. Чугай О.О., Любінець Л.А. Фагоцитарна активність лейкоцитів у динаміці розвитку експериментальної пневмонії. *Світ медицини та біології*. 2017. № 2(60) С. 172-174.

38. Чумаченко В.В. Біохімічні та імунологічні основи системи профілактики стресу в свиней: автореф. дис. ... д-ра вет. наук : 03.00.04. “Біохімія” / В.В. Чумаченко. К., 2007. 36 с.
39. Шахов В.П., Гумилевский Б.Ю. Феномен трехклеточной кооперации макрофаг — Т-лимфоцит — кроветворная клетка в гемопоэтическом островке при стрессе. *Клеточная иммунология*. 1999. Т.3. С.25-26.
40. Шилов Ю.И., Орлова Е. Г. Адренергические механизмы регуляции функций фагоцитирующих клеток периферической крови крыс при остром стрессе. *Медицинская иммунология*. 2002. №1. URL: <https://scholar.google.ru/citations?user=LcIgWcIAAAAJ&hl=ru>
41. Ярилин А.А. Основы иммунологии: Учебник. М.: Медицина, 1999. 608 с.
42. Glovatchcka V., Ennes H., Mayer E.A., Bradesi S. Chronic stress-induced changes in pro-inflammatory cytokines and spinal glia markers in the rat: a time course study. *Neuroimmunomod.* – 2012. – Vol. 19 (6). – P. 367–376.
43. Krogh A.Kh., Haaber J., Bochsén L., Ingmer H., Kristensen A.T. Aggregating resistant *Staphylococcus aureus* induces hypocoagulability, hyper fibrinolysis, phagocytosis, and neutrophil, monocyte, and lymphocyte binding in canine whole blood. *Vet. Clin. Pathol.*, 2018, vol. 47, no. 4, pp. 560–574. doi: 10.1111/vcp.12679 URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/vcp.12679>
44. Lauvau G., Chorro L., Spaulding E., Soudja S.M. Inflammatory monocyte effector mechanisms. *Cell Immunol.*, 2014, vol. 1–2, no. 291, pp. 32–40. doi: 10.1016/j.cellimm.2014.07.007 URL: <https://europepmc.org/article/pmc/pmc4457438>
45. Madden K.S., Feltrn D.L. Experimental basis for neural-immune interactions. *Physiol.Rev.* 1995. Vol. 75. N1. P.77-106/

46. Pellme S., Dahlgre N.C., Karlsson A. The two neutrophil plasma membrane markers alkaline phosphatase and HLA class I antigen localize differently in granule-deficient cytoplasts. An ideal plasma membrane marker in human neutrophils is still lacking. *J. Immunol. Methods*. 2007. 325. P. 1562–1570. URL: <http://europepmc.org/article/med/17673253>
47. Rockall AG, Rickards PJ. Imaging of the pulmonary anifestations of systemic disease. *Postgrad Med J*. 2001; 34: 621–38. URL: <https://pmj.bmj.com/content/77/912/621>
48. Wigley F. Vascular disease in scleroderma. *Clini Rev Allergy and Immunol*. 2009; 36(25): 150–74.