

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Коваленко Тетяна Ігорівна

УДК 612.071.1:612.66:616-097.1-092.9

ДИСЕРТАЦІЯ
«ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ЗМІНИ ПОКАЗНИКІВ КЛІТИННОГО ТА
ГУМОРАЛЬНОГО ІМУНІТЕТУ ПІСЛЯ ДІЇ ІНФЕКЦІЙНИХ АНТИГЕНІВ
В ЕКСПЕРИМЕНТІ»

Спеціальність 03.00.13 – «Фізіологія людини і тварин»
(Біологічні науки)

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____Т. І. Коваленко

Науковий керівник Клімова Олена Михайлівна, доктор біологічних наук,
професор.

Харків - 2017

АНОТАЦІЯ

Коваленко Т. І. Вікові особливості зміни показників клітинного та гуморального імунітету після дії інфекційних антигенів в експерименті. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини та тварин (Біологічні науки). – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, Харків, 2017.

Для вирішення фундаментальних проблем геріатрії й медичної геронтологічної практики важливим є з'ясування наявності та характеру можливих вікових змін імунної відповіді на природні та синтетичні антигени в онтогенезі на тлі формування вторинного адаптивного імунітету.

Організм обирає ті чи інші механізми захисту від чужорідних антигенів залежно від їх імуногенності й патогенності. На першому етапі забезпечення захисту від чужорідних антигенів здійснюється за допомогою бар'єрної функції антигенпрезентуючих клітин, знищення антигену залежить від їхньої здатності до фагоцитозу. Важливим є також наступний каскад індивідуальних реакцій, що забезпечують імунний захист на всіх етапах онтогенезу. Відомо, що при недостатній функції однієї з ланок імунореактивності може компенсаторно активуватися або інгібуватися функція інших факторів імунітету.

Відповідно до сучасної концепції біогеронтології, порушення функціонального стану імунної та ендокринної систем є однією з основних причин прискореного старіння. З віком відбуваються функціональні зміни регуляторних механізмів імунонейроендокринного комплексу, змінюються когнітивні функції. З віком знижується рівень імунної відповіді, порушується здатність лімфоцитів у передачі міжклітинних сигналів, зменшується різноманітність репертуару Т-клітинних рецепторів, в ендокринній системі

порушується продукція статевих гормонів. Дані процеси взаємопов'язані, оскільки стероїди пригнічують функцію імунної системи.

Однак дотепер недостатньо даних про зміни регуляторних механізмів імунної відповіді залежно від віку. Недостатньо вивчені молекулярні події та клітинні взаємодії, що лежать в основі механізмів імунореактивності, що забезпечують розвиток адаптації на різних етапах онтогенезу.

Для розуміння особливостей імунофізіологічних процесів важливим є комплексний підхід при аналізі результатів, які свідчать про порушення функцій фагоцитуючих клітин і зміни гуморальних реакцій імунітету у віковому аспекті.

Вивчення особливостей імуногенезу на тлі індукованого запалення на експериментальних моделях тварин різного віку дозволить обґрунтувати підходи до адресної імунокорекції та імунопрофілактики в різних вікових групах.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню особливості онтогенетичних змін імунореактивності й імунорезистентності на тлі запального процесу, індукованого різними грамнегативними антигенами (*P. aeruginosa*, *E. coli*) у тварин різного віку, а також після застосування різних імунокоректорів (поліоксидонію, міксфактора). У ході дослідження виявили, що в молодих контрольних тварин була збільшена концентрація гуморального опсонізуючого чинника вродженого імунітету C3 фрагменту комплемента порівняно зі старшою контрольною групою тварин. Також спостерігали в молодих контрольних тварин збільшення в 2 рази концентрації циркулюючих імунних комплексів. У контрольних тварин старшої групи виявили зниження індукційної ферментативної активації утворення синглетних форм кисню для забезпечення кисневозалежного процесингу антигена порівняно з молодшою контрольною групою тварин.

Під час дослідження виявили, що запальний процес, індукований в експериментальних тварин різного віку грамнегативними мікроорганізмами двох видів спричинив зниження показників кисневонезалежного фагоцитозу на всіх етапах обстеження (3-я, 5-а, та 7-а доба). Показано, що у тварин старшої вікової групи на тлі запального процесу активація показників вродженого клітинного й

гуморального імунітету була більш вираженою, ніж у молодих експериментальних тварин.

При дослідженні вмісту імуноглобулінових антитіл (Ig A, M і G) на тлі запальної реакції в експериментальних тварин різного віку спостерігали збільшення цих досліджуваних показників на всіх етапах обстеження, крім Ig A на 5-у добу експерименту. Після дії бактеріальних суспензій *P. aeruginosa* і *E. coli* інтенсивність утворення циркулюючих імунних комплексів між антигеном та імуноглобуліном була достовірно збільшена протягом усього експерименту у тварин двох вікових категорій, що свідчить про активацію зв'язування бактерій імуноглобулінами.

На другому етапі експерименту використовували різні імунокоректори: П., який містить маніт та природний антиоксидант бетакаротин, який діє на фагоцитуючі клітини, який вже широко застосовується в медичній практиці. Іншій групі експериментальних тварин різного віку на другому етапі дослідження вводили експериментальний композитний препарат М., що складається з амінокислот, нуклеотидів, ферментів, вітамінів та олігопептидів, які стимулюють експресію генів прооксидантних ферментів

Ці препарати вводили контрольним тваринам та тваринам із запаленням, індукованим введенням внутрішньочеревинно суспензією *E. coli*. Експериментальним тваринам препарати вводили превентивно за 48 годин до індукції запалення та після 24 годин системного запального процесу (після введення *E. coli*).

Після введення імунокоректора П. через 24 години після формування індукованої запальної реакції введенням *E. coli* в експериментальних тварин двох вікових груп достовірно збільшувався індекс стимуляції гранулоцитарних нейтрофілів в НСТ-тесті, особливо на ранньому терміні запалення, а застосування поліоксидонію превентивно до введення антигену *E. coli*, навпаки, викликало інгібування кисневозалежного фагоцитозу.

Після дії *E. coli* і застосування експериментального композитного препарату М. у тварин старшої вікової групи виявили виражену стимуляцію функціональної

активності процесингу антигенів, про що свідчать високі показники індексу завершеності фагоцитозу. В експериментальних тварин старшої групи М. стимулював утворення комплексу антиген–антитіло–комплемента з подальшою елімінацією цього комплексу протягом усього експерименту.

Таким чином, результат запального процесу в експериментальних тварин залежить від стадії запального процесу, від вікових особливостей експериментальних тварин, від виду антигену, індукованого запальним процесом, і від різновиду імунокоректора.

Уперше при порівнянні імунологічних показників у контрольних групах тварин різного віку виявили відмінності показників вродженої ланки імунітету. У контрольних тварин старшої групи порівняно з 3 місячними тваринами була знижена активація кисневозалежного фагоцитозу в НСТ дослідженні. У молодих контрольних тварин спостерігалось підвищення концентрації фактора опсонізації С3 фрагмента комплексу.

Уперше показано, що молоді та старі тварини після інфікування грамнегативними мікроорганізмами (*P. aeruginosa* і *E. coli*) вибирають різну стратегію для процесингу бактеріальних антигенів. У тварин старшої групи після інфікування досліджуваними мікроорганізмами були більш виражені показники вродженого імунітету (активність фагоцитозу і С3 фрагмента комплексу).

Уперше показано, що при дослідженні ефектів різних інфекційних антигенів спостерігали більш виражену локальну й системну запальну реакцію після введення *E. coli*.

Уперше показано, що при застосуванні композитного препарату М. після дії патогена *E. coli* у тварин двох вікових груп спостерігали стимуляцію активності фагоцитозу й збільшення концентрації С3 фрагмента комплексу, який має виражену опсонізуючу дію, що свідчить про адаптивний зв'язок процесів реактивності та резистентності експериментальних тварин різного віку.

Показано, що в старшій віковій групі на тлі бактеріального зараження *E. coli* та введення міксфактора відбувається активація кисневозалежного фагоцитозу нейтрофілів протягом усього експерименту.

Уперше показано, що досліджувані імунокоректори мають різні механізми впливу на експериментальних тварин залежно від віку й термінів введення щодо розвитку запалення.

Уперше було показано, що основною характеристикою імунної відповіді молодих тварин можна вважати їхню високу реактивність до чужорідних агентів, а у старих тварин, навпаки, виявили більшу резистентність до інфекційних антигенів при індукції запальної реакції.

Матеріали цієї дисертаційної роботи можуть використовуватися в практиці при з'ясуванні імунологічного резерву організму різної вікової категорії під дією збудників, які містять у своєму складі ліпополісахарид. Ці дослідження можуть бути використані для вибору імуномодуючих препаратів на різних етапах запального процесу з урахуванням вікових особливостей організму та розроблення методичних рекомендацій. Імунокоректор П. доцільно застосовувати після індукції запального процесу мікроорганізмами, оскільки він має виражену антиоксидантну активність. Композитний імунопрепарат М. краще застосовувати превентивно до індукції запалення через те, що цей препарат стимулює експресію генів прооксидантних ферментів. Матеріали цієї роботи можуть викладатися студентам у рамках курсу мікробіології, імунології, фізіології, а також спеціалізованого курсу «Лабораторна діагностика» у Харківському національному медичному університеті.

Ключові слова: вроджений імунітет, адаптивний імунітет, фагоцитоз, запальний процес, вікові групи тварин, антигени, імунореактивність, імунорезистентність.

ABSTRACT

Kovalenko T. I. Age features of changes in the indices of cellular and humoral immunity after influence of infectious antigens in the experiment. – Qualification scientific paper, manuscript.

Thesis for a Candidate Degree in Biology: Speciality 03.00.13 – Human and Animal Physiology (Biology). –V. N. Karazin Kharkiv National University, the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2017.

For solving of fundamental problems of geriatric and gerontological health practices it is important to ascertain the presence and nature of possible age-related changes of the immune response to natural and synthetic antigens in ontogenesis on the background of the formation of secondary adaptive immunity.

The body selects these or those mechanisms of defense against alien antigens based on their immunogenicity and pathogenicity. On the first stage of the protection against alien antigens the barrier function of antigenpresenting cells, the destruction of the antigen depends on their ability to phagocytosis are carried out. The following cascade of individual reactions which provide the immune protection in all stages of ontogenesis is also important. It is known that in case of insufficient function of one of the units of immunoreactivity can be activated compensatory or a function of other factors of immunity in different age groups.

According to the modern concept of biogerontology, violations of the functional state of immune and endocrine systems are one of the main reasons for accelerated aging. Within the age the functional changes of regulatory mechanisms mannopyranoside complex is changing in cognitive function take place. Within the age the level of immune response is decreasing, ability of lymphocytes in the control of intercellular signaling is violating, repertoire diversity of T-cell receptors is reducing, in the endocrine system the producing of sex hormones is disturbed. These processes are interrelated, because steroids suppress the immune system.

However, there is still a lack of data on changes of regulatory mechanisms of the immune response depending on age the molecular events and cellular interactions underlying the mechanisms of immunoreactivity for the development of adaptation at different stages of ontogenesis have not been studied properly.

For the understanding of peculiarities of immune and phisiological processes it is important a holistic approach in the analysis of the results, which indicate the

dysfunction of phagocytotic cells and humoral responses of the immune system in the age aspect.

The study of immunogenesis peculiarities on the background of induced experimental inflammation in animal models of different ages to justify a targeted approach to immunomodulation and immunoprevention in different age groups.

This thesis is devoted to studying of the peculiarities of the ontogenetic changes of immunoreactivity and immuno-resistency on the background of the inflammatory process induced by different gram-negative antigens (*P. aeruginosa*, *E. coli*) in animals of different age, and after using of various immunomodulators (polioksidonium, mixfactor). The study found that in young animals of control group the concentration of humoral opsonic factor of the congenital immunity of the C3 fragment of complement in comparison with the control group of older animals was increased. The two-times increase of the concentration of circulating immune complexes were also observed in young control animals. In the control animals of the older group a reduction in induction of the enzymatic activation of the formation of singlet forms of oxygen to ensure cinemasonline processing of antigen in comparison with the younger control group of animals were showed.

The study found that the inflammatory process induced in the experimental animals of different age by gram-negative organisms of the two species led to the declining of the phagocytosis indexes at all stages of examination (3^d, 5th and 7th day). It is shown that animals of older age group on the background of inflammatory process activation of the congenital indicators of cellular and humoral immunity were more pronounced than young experimental animals.

In the study of the content of immunoglobulin antibodies (Ig A, M and G) on the background of inflammatory responses in experimental animals of different age except for Ig A on the 5th day of the experiment an increase in these studied parameters at all stages of the research was observed. After exposure of bacterial suspensions of *P. aeruginosa* and *E. coli* the intensity of formation of circulating immune complexes between antigen and immunoglobulin was significantly increased throughout the

experiment in animals of the two age categories that suggests activation of binding immunoglobulins bacteria.

In the second phase of the experiment different immunomodulators were used: P., which contains mannitol and a natural antioxidant beta- carotene, acting phagocytose cells, which had already widely used in medical practice. Another group of experimental animals of different ages in the second phase of the study was injected by experimental composite preparation M. consisting of aminoacids, nucleotides, enzymes, vitamins and agapetes, which stimulate gene of prooxidant enzymes expression.

These medicines were injected to control animals and animals with inflammation which was induced by intraperitoneal introduction of suspension of *E. coli*. the drugs were administered to experimental animals preventively 48 hours before induction of inflammation and after 24 hours of systemic inflammatory process (after entering *E. coli*).

After injecting of the immunomodulator P. during 24 hours after the formation of the induced inflammatory response to the introduction of *E. coli* in experimental animals of the two age groups significantly increased the stimulation index granulocyte of neutrophils in NBT-test, especially in the early period of the inflammation, and the use of polyoxidonium as a preventive measure before the injecting of the antigen *E. coli*, on the contrary, caused inhibition of oxygen-dependent phagocytosis.

After the action of *E. coli* and the use of experimental composite preparation of M. in the animals of the older-age group the expressed stimulation of the functional activity of processing of antigens was found, as evidenced by high index of completeness of phagocytosis. In experimental animals of older-age group M. stimulated the formation of the complex antigen–antibody–complement with subsequent elimination of the complex during the entire experiment.

Thus, the result of the inflammatory process in the experimental animals depends on the stage of the inflammatory process, on the age characteristics of the experimental animals, on the type of antigen-induced inflammatory process and on variety of the immunomodulators.

First, when comparing of immunological parameters in control groups of the animals of different age it was revealed the differences in indicators of congenital immunity. In the control group of the animals of the older-age group in comparison with the 3-month animals oxygen-dependent activation of phagocytosis in the NST research was reduced. In young control animals there was an increase in the concentration of opsonization factor of C3 fragment of complement.

It was firstly shown that young and old animals after infecting with gramnegative organisms (*P. aeruginosa* and *E. coli*) choose different strategies for the processing of bacterial antigens. In animals of older group after infecting, the studied microorganisms were more pronounced indicators of the congenital immunity (the activity of phagocytosis and C3 fragment of complement).

It was firstly shown when studying of the effects of various infectious antigens more pronounced local and systemic inflammatory response after the introduction of *E. coli* was observed.

First it was shown that at the use of composite M. drug after exposure to the pathogen *E. coli* in animals of two age groups the stimulation of phagocytosis activity and the increase in the concentration of the C3 fragment of complement, which has a strong opsonic action, evidence of adaptive coupling processes of reactivity and resistance of experimental animals of different age was observed

It was shown that in the older-age group on the background of bacterial infection *E. coli* and the introduction of mixfactor the activation of oxygen-dependent of granulocyte phagocytosis of neutrophils throughout the experiment took place.

It was shown that the investigated immunomodulators have different mechanisms of action in experimental animals depending on age and timing of the insert in relation to the development of inflammation.

It was first shown as the main characteristics of the immune response of young animals can be seen as their high reactivity to alien agents, and in older animals, on the contrary, it was revealed highest resistance to infectious antigens in the induction of the inflammatory response.

The content of this thesis can be used in practice in clarifying of the immunological condition of the different age groups under the action of pathogens which contain a lipopolysacharide. These studies can be used to select immunomodulator drugs at various stages of the inflammatory process taking into consideration age peculiarities of the organism and development guidelines. Immunocorrector P. is advisable to apply after the induction of the inflammatory process by the microorganisms, as it has a manifested antioxidant activity.

Composite immunopreparation of M. may be used better preventively before the induction of inflammation due to the fact that this drug stimulates the gene of prooxidant enzymes expression. The materials of this work can be taught to the students in the framework of Microbiology, Immunology, Physiology, and specialized course “Laboratory diagnostics” in Kharkiv National Medical University

Key words: congenital immunity, adaptive immunity, phagocytosis, inflammatory process, age animals groups, antigens, immunoreactivity, immunoiresistance.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті, які входять до переліку фахових видань України

1. Коваленко Т. І. Вроджена клітинна відповідь у експериментальних тварин різного віку на тлі запалення і введення імунокоректорів // Український біофармацевтичний журнал. 2017. № 5(52). С. 16–20.

2. Коваленко Т. И., Минухин В. В., Климова Е. М. Влияние композитного препарата на ферментативную активность нейтрофилов у крыс разного возраста при генерализованном воспалительном процессе // Вісник проблем біології і медицини. 2015. № 2, Т. 4 (121). С. 129–131. *"Особистий внесок здобувача: проведено основний обсяг пошукової роботи, отримано результати дослідження ферментативної активності нейтрофілів периферичної крові, підготовлено матеріали до друку"*.

3. Климова Е. М., Коваленко Т. И., Минухин В. В., Агаркова А. Н. Оценка факторов первичной иммунорезистентности на экспериментальной модели инфекционного процесса у животных разного возраста // Імунологія та Алергологія. Наука і практика. 2014. № 3. С. 94–99. (Фахове згідно з наказом від 01.07.2010 р. № 1-05/5). *"Особистий внесок здобувача: отримано результати дослідження фагоцитарної активності нейтрофілів периферичної крові, підготовлено матеріали статті до друку"*.

Статті, що входять до міжнародних наукометричних баз

4. Коваленко Т. И., Минухин В. В., Климова Е. М. Иммунорезистентность экспериментальных животных разного возраста на модели генерализованного воспалительного процесса // Світ медицини та біології. 2015. № 3 (52). С. 106–109. (Russian Science Citation Index, Index Copernicus, Google Scholar, "Cyberleninka"). *"Особистий внесок здобувача: проведено основний обсяг пошукової роботи,*

виконано статистичну обробку отриманих матеріалів та підготовлено матеріали до друку".

5. Коваленко Т. И., Минухин В. В., Климова Е. М., Быченко А. А., Мушли Али. Изучение ферментативной активности гранулоцитарных нейтрофилов у животных с экспериментальной инфекцией разного возраста // Актуальные вопросы современной медицины. Сб. науч. тр. по итогам межвузовской ежегодной заочной научно-практической конференции с международным участием. 2014. С. 86–89. (РИНЦ). *"Особистий внесок здобувача: проведено основний обсяг пошукової роботи, отримано результати дослідження ферментативної активності нейтрофілів периферичної крові, підготовлено матеріали статті до друку".*

Електронне видання

6. Коваленко Т. И., Климова Е. М., Минухин В. В. Концентрация циркулирующих иммунных комплексов при экспериментальном генерализованном процессе у животных разного возраста под действием иммуномодуляторов // Анналы Мечниковського інституту. 2015. № 2. С. 220–223. URL: www.imiamn.org.ua/journal/2_2015/PDF/42. (дата обращения: 10.11.2015). (Index Copernicus, Global Impact Factor). *"Особистий внесок здобувача: проведено основний обсяг пошукової роботи, підготовлено матеріали до написання статті".*

Статті у зарубіжних спеціалізованих виданнях

7. Коваленко Татьяна Игоревна. Климова Елена Михайловна, Минухин Валерий Владимирович, Кузьменко Андрей Николаевич. Оценка активности фагоцитоза у животных разного возраста при генерализованном воспалительном процессе на фоне применения иммунного препарата // Cambridge Journal of Education and Science, «Cambridge University Press». Great Britain, 2016. № 1 (15). P. 178–184. *"Особистий внесок здобувача: проведено основний обсяг пошукової*

роботи, отримано результати дослідження фагоцитарної активності нейтрофілів периферичної крові, підготовлено матеріали до друку".

8. Коваленко Татьяна Игоревна, Климова Елена Михайловна, Минухин Валерий Владимирович, Кузьменко Андрей Николаевич. Влияние Полиоксидония на содержание компонента С3 комплемента у крыс разного возраста при генерализованном процессе // Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe (East European Scientific Journal). 2015. № 2. С. 121–124. (РИНЦ). *"Особистий внесок здобувача: проведено основний обсяг пошукової роботи, виконано статистичну обробку отриманих матеріалів підготовлено матеріали статті до друку".*

Тези науково-практичних конференцій різного рівня

9. Коваленко Т. И., Климова Е. М. Оценка врожденного клеточного фактора иммунного ответа у крыс разного возраста при экспериментальном инфекционном процессе и применении иммунокоректора // Нове та традиційне у дослідженнях сучасних представників медичної науки: збірник матеріалів міжнародної науково-практ. конф., 26–27 лютого 2016 р. Львів, 2016. С. 93–95.

10. Коваленко Т. І., Турута Д. О. Вивчення гуморальної ланки імунної відповіді на експериментальних моделях запального процесу у тварин двох вікових груп після дії антигенів *P. aeruginosa* // Медицина третього тисячоліття: збірник тез міжвузівської конференції молодих вчених та студентів ХНМУ, 20 січня 2015 р. Харків, 2015. С. 28–29. *"Особистий внесок здобувача: отримано результати дослідження сироватки крові імуноглобулінів та фрагменту С3 комплементу, підготовлено матеріали до друку".*

11. Коваленко Т. И., Климова Е. М. Интенсивность образования циркулирующих иммунных комплексов у экспериментальных животных разного возраста с моделью воспаления и после действия комбинированного пептидного препарата // Пріоритети сучасної медицини: теорія і практика: матеріали міжнародної науково-практичної конференції, 6–7 лютого 2015 р. Одеса, 2015. С. 195–196.

12. Коваленко Т. И., Климова Е. М. Возрастные особенности иммунного ответа у экспериментальных животных после действия инфекционных антигенов // Медична наука і сучасність – 2015: матеріали міжнародної науково-практичної конференції, 24 –25 квітня 2015 р. Київ, 2015. С. 69–72.

13. Kovalenko T. I., Panich R. V. The change in the concentration of C3 fragment of complement in inflammation and use of the immunocorrection drug in experimental animals of different ages // For medical students and young scientists: 8th International Scientific Interdisciplinary Conference, 14th–15th may 2015. Kharkiv, 2015. P. 233–234. *"Особистий внесок здобувача: зроблено основний обсяг пошукової роботи, підготовлено матеріали до друку"*.

14. Коваленко Т. И., Климова Е. М., Панич Р. В. Формирование первичной иммунорезистентности у животных разного возраста на экспериментальной модели воспалительного процесса // Актуальні питання боротьби з інфекційними захворюваннями: тези доповідей міжнародної науково-практичної конференції, 14–15 травня 2015. Харків, 2015. С. 23. *"Особистий внесок здобувача: зроблено аналіз отриманих результатів, підготовлено матеріали до написання тез"*.

15. Коваленко Т. И., Клімова О. М. Оцінка гуморальних факторів первинного та вторинного імунітету після дії антигенів *E. coli* у експериментальних тварин різного віку // Механізми функціонування фізіологічних систем: матеріали міжнародної науково-практичної конференції, 15–17 жовтня 2014. Львів, 2014. С. 46–47.

Сатті, які додатково відображають наукові результати дисертації

16. Коваленко Т. И., Климова Е. М. Возрастные изменения клеточного и гуморального звена иммунорезистентности у экспериментальных животных разного возраста при воспалении // Медичний форум. 2016. № 7 (07). С. 85–88.

17. Коваленко Т. И. Формирование гуморального ответа после действия антигенов *P. aeruginosa* и *E. coli* у экспериментальных животных разного возраста // Експериментальна і клінічна медицина. 2015. № 1(66). С. 24–27.

18. Коваленко Т. И., Климова Е. М., Минухин В. В., Агаркова А. Н. Оценка клеточных и гуморальных факторов иммунорезистентности на экспериментальной модели воспалительного процесса у животных разного возраста // Лабораторна діагностика. 2014. № 4(70). С. 36–41. *"Особистий внесок здобувача: виконано основний обсяг пошукової роботи, підготовлено матеріали статті до друку"*.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	19
ВСТУП.....	20
РОЗДІЛ 1. ПЕРВИННИЙ ВРОДЖЕНИЙ ТА ВТОРИННИЙ АДАПТИВНИЙ ІМУНІТЕТ НА ТЛІ ЗАПАЛЕННЯ (літературний огляд)...	28
1. 1 Формування та роль вродженої клітинної та гуморальної імунорезистентності.....	28
1. 1. 1 Фактор вродженого імунітету – фагоцитозу в забезпеченні резистентності від мікроорганізмів.....	31
1. 1. 2 Система комплементу.....	35
1. 2 Адаптивний імунітет при старінні.....	39
1. 2. 1 Класи імуноглобулінів.....	42
1. 2. 2 Циркуючі імунні комплекси.....	43
1. 3 Порухення клітинної і гуморальної імунорезистентності.....	44
1. 4. Механізм взаємодії антигену з макроорганізмом.....	46
1. 4. 1. Характеристика <i>Escherichia coli</i>	50
1. 4. 2 Характеристика <i>Pseudomonas aeruginos</i>	51
1. 4. 3 Активація нейтрофілів під дією ліпополісахариду грамнегативних мікроорганізмів.....	52
Висновки до розділу 1.....	55
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	56
2.1 Характеристика об'єкта дослідження.....	56
2.2 Схема експерименту.....	57
2.3 Характеристика лабораторних методів дослідження.....	59
2. 3. 1 Оцінка фізіологічних параметрів експериментальних тварин.....	59
2. 3. 2 Визначення фагоцитарної реакції нейтрофілів крові.....	60
2. 3. 3 Визначення загальної окисно-відновної активності	

нейтрофілів в тесті відновлення нітросинім тетразолієм (НСТ-тест).....	61
2. 3. 4 Визначення рівня циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) в сироватці крові щурів.....	64
2. 3. 5 Визначення С3 фрагмента комплементу.....	65
2. 3. 6 Визначення концентрації вмісту сироваткових імуноглобулінів класів А, М, G.....	66
2.4 Статистична обробка результатів дослідження.....	67
Висновки до розділу 2.....	67
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.....	69
3. 1 Оцінка фізіологічних параметрів експериментальних тварин.....	69
3. 2 Показники кисневонезалежного і кисневозалежного фагоцитозу нейтрофілів контрольних та тварин різного віку з експериментальною інфекцією	70
3. 3 Дослідження гуморальної ланки імунітету після дії <i>P. aeruginosa</i> та <i>E. coli</i> контрольних та експериментальних тварин різного віку.....	79
3. 4 Оцінка фізіологічних параметрів експериментальних тварин на тлі запалення, індукованого антигеном <i>E. coli</i> і введення П.....	85
3. 5 Показники кисневонезалежного і кисневозалежного фагоцитозу нейтрофілів контрольних тварин та тварин різного віку з експериментальною інфекцією після введення <i>E. coli</i> і застосування П... ..	86
3. 6 Динаміка зміни концентрації ЦІК і вміст С3 фрагмента комплементу тварин різного віку з запаленням, індукованим <i>E. coli</i> , після введення П.....	93
3. 7 Оцінка фізіологічних параметрів експериментальних тварин на тлі запалення, індукованого антигеном <i>E. coli</i> , і введення М.....	95
3. 8 Показники кисневонезалежного і кисневозалежного фагоцитозу нейтрофілів контрольних та експериментальних тварин різного віку з моделлю запалення, індукованого введенням <i>E. coli</i> на тлі застосування М..	97

3. 9 Динаміка зміни концентрації ЦІК і вміст С3 фрагмента комплемента у тварин різного віку з запаленням, індукованим <i>E. coli</i> після введення М.....	102
Висновки до розділу 3.....	105
ВИСНОВКИ.....	110
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	113
ДОДАТОК 1 Список публікацій здобувача за темою дисертації.....	132
ДОДАТОК 2 Акт впровадження.....	137

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ІЗФ - індекс завершеності фагоцитозу

ІК - імунні комплекси

ІС - індекс стимуляції

КУО - колонеутворююча одиниця

КФЧ - коефіцієнт фагоцитарного числа

ЛПС - ліпополісахарид

МПА – м'ясопептонний агар

М - міксфактор

НСТ - нітросиній тетразолій

П - поліоксидоній

ПЕГ - поліетиленгліколь

СМФ - система моноклеарних фагоцитів

Сп – спонтанний тест

СЦК - середній цитохімічний коефіцієнт

Ст – стимульований тест

ФІ - фагоцитарний індекс

ФЧ - фагоцитарне число

ЦК - циркулюючі імунні комплекси

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Для вирішення фундаментальних проблем геріатрії й медичної геронтологічної практики важливим є з'ясування наявності та характеру можливих вікових змін імунної відповіді на природні та синтетичні антигени в онтогенезі на тлі формування вторинного адаптивного імунітету [38].

Захист від зовнішніх і внутрішніх негативних факторів в організмі здійснюється за допомогою вродженої ланки резистентності, а також за допомогою адаптивних гуморальних і клітинних факторів імунологічного захисту. На всіх етапах онтогенезу розпізнавання й елімінація чужорідних антигенів в організмі поетапно вмикаються різні ланки імунітету, які спільно забезпечують всі типи імунологічного захисту: фагоцитарний бар'єр, опсонізуюча дія білків системи комплементу та імуноглобулінів, кілерна або супресорна функція Т-лімфоцитів, кисневозалежна фагоцитарна активність гранулоцитарних нейтрофілів та утворення циркулюючих імунних комплексів. Організм обирає ті чи інші механізми захисту від чужорідних антигенів залежно від їх імуногенності й патогенності [12, 91]. Перший етап забезпечення захисту від чужорідних антигенів здійснюється за допомогою бар'єрної функції антигенпрезентуючих клітин, знищення антигену залежить від їхньої здатності до фагоцитозу [23]. Важливим є також наступний каскад індивідуальних реакцій, що забезпечують імунний захист на всіх етапах онтогенезу [126]. Відомо, що при недостатній функції однієї з ланок імунореактивності може компенсаторно активуватися або інгібуватися функція інших факторів імунітету [31, 103]. Іноді на тлі пролонгованого впливу інфекційних антигенів можуть формуватися перехресні аутоімунні реакції або імунологічна анергія [81, 100].

Порушення бар'єрної захисної функції може відбуватися через недостатність ендоцитозу антигенів у фагоцитуючих клітинах що може сприяти створенню осередків інфекції в організмі, хронічної сенсibiliзації інших факторів імунітету [85]. Це супроводжується накопиченням в організмі великої кількості

цитотоксичних чинників різної природи, які можуть формувати локальні або системні запальні процеси [58, 97].

Відповідно до сучасної концепції біogerонтології, порушення функціонального стану імунної та ендокринної систем є однією з основних причин прискореного старіння [4, 5, 143, 181]. З віком відбуваються функціональні зміни регуляторних механізмів імуннонейроендокринного комплексу, змінюються когнітивні функції (пам'ять, увага, орієнтація, вища психічна діяльність) [69,89]. За даними деяких авторів при старінні знижується рівень імунної відповіді, порушується здатність лімфоцитів у передачі міжклітинних сигналів, зменшується різноманітність репертуару Т-клітинних рецепторів, в ендокринній системі порушується продукція статевих гормонів. Ці процеси взаємопов'язані, оскільки стероїди пригнічують функцію імунної системи [173].

Інші автори вважають, що недостатньо висвітлено в світовій науковій літературі проблема вікових відмінностей адаптаційних можливостей організму [13, 110]. Отримані дані про зміни метаболічного стану, рівня експресії генів, функції імунної та нейроендокринної систем при старінні змушують припустити наявність різної здатності до адаптації молодих і старих організмів [17]. Перевести на якісно новий рівень уявлення про здатність імунної системи до адаптації в різних вікових групах дозволяють дані про продукцію імунокомпетентними клітинами численних регуляторних молекул (цитокінів, факторів росту, стимуляторів проліферації) [7, 9]. Однак дотепер недостатньо даних про зміни регуляторних механізмів імунної відповіді в залежності від віку. Недостатньо вивчені молекулярні події та клітинні взаємодії, що лежать в основі механізмів імунореактивності, що забезпечують розвиток адаптації на різних етапах онтогенезу. Є дані, що тварини в залежності від віку у відповідь на дію ксенобіотиків змінюють вираженість й спрямованість метаболічних реакцій [19, 63]. Однак не ясні причини вікових відмінностей реакції організмів на токсичні фактори.

Розвиток концепції адаптогенеза неможливий без урахування онтогенетичних особливостей індукції бар'єрних вроджених і адаптивних факторів резистентності (16, 184). Важливим є з'ясування молекулярних і клітинних механізмів, що беруть участь в імуногенезі в різних вікових групах під дією інфекційних антигенів. Актуальним є розробка і обґрунтування різних підходів для усунення прискорення старіння і вікової патології, що спрямовані на збільшення середньої тривалості життя, збереження активного довголіття й досягнення видової межі життя (160).

Можливо, дослідження імунореактивості після дії інфекційних чинників на експериментальних тваринах різного віку допоможе не тільки зрозуміти молекулярні механізми формування адаптивних пристосувань, але й прояснити причини старіння організмів. Тому сьогодні актуальним є вивчення етапів формування типів імунорезистентності при індукованих запальних процесах в експерименті на тваринах різного віку і після застосування імунокоректорів на тлі індукованого запального процесу. Вивчення особливостей імуногенезу на тлі індукованого запалення на експериментальних моделях тварин різного віку дозволять обґрунтувати підходи до адресної імунокорекції та імунопрофілактики в різних вікових групах.

Для розуміння особливостей імунофізіологічних процесів важливим є комплексний підхід при аналізі результатів, які свідчать про порушення функцій фагоцитуючих клітин і зміни гуморальних реакцій імунітету у віковому аспекті.

Мета і завдання дослідження. Метою цієї роботи було дослідження динаміки в залежності від віку імунореактивності на інфекційні агенти та можливості корекції цих станів імуотропними препаратами.

Для реалізації поставленої мети були визначені такі завдання:

– Оцінити зміну показників вродженого й адаптивного імунітету (активність фагоцитозу, концентрацію опсонізуючого фактора С3 фрагмента комплементу, вміст імуноглобулінів класів Ig A, Ig M, Ig G і рівень ЦІК у контрольних тварин різного віку).

– Дослідити показники кисневонезалежного й кисневозалежного фагоцитозу, концентрації С3 фрагмента комплементу, вміст імуноглобулінів А, М, G і рівень циркулюючих імунних комплексів у тварин різного віку із запаленням, після інфікування суспензією *P. aeruginosa*.

– Проаналізувати зміну показників активності вродженого й адаптивного імунітету тварин різного віку з індукованою запальною реакцією після інфікування суспензією *E. coli*.

– Дослідити зміну активності фагоцитозу, концентрації С3 фрагмента комплементу і вміст ЦІК у контрольних тварин різного віку після введення імуномодуляторів П. та М.

– Порівняти зміни активності фагоцитозу, вміст і споживання С3 фрагмента комплементу й зміну концентрації циркулюючих імунних комплексів у тварин різного віку, інфікованих суспензією *E. coli* на тлі застосування імуномодулятора П. на різних етапах запального процесу.

– Дослідити в динаміці показники фагоцитозу, концентрацію С3 фрагмента комплементу, циркулюючих імунних комплексів у тварин різного віку, інфікованих суспензією *E. coli* на тлі застосування імуномодулятора М. на різних етапах запального процесу.

- *об'єкт дослідження* – фактори імунітету у експериментальних тварин різного віку.

- *предмет дослідження* – оцінка зміни показників імунорезистентності в залежності від віку після застосування різних інфекційних антигенів та після дії різних імунокоректорів.

Методи дослідження. Базуються на комплексному використанні принципів об'єктивності та достовірності. Оцінка фізіологічних показників (рухова активність, температура, вага, апетит, гемодинаміка (частота серцевих скорочень, задишка), вологість та стан шкірних покривів). Імунологічні дослідження: метод завершеного фагоцитозу з тест-культурою – морфологічний метод у мазках крові – для визначення фагоцитарної активності нейтрофілів периферичної крові: кисневий метаболізм нейтрофілів досліджували за їхньою здатністю поглинати

нітросиній тетразолій і відновлювати його до діформазана у вигляді гранул синього кольору під дією супероксиданіона, який утворюється в НАДФ – оксидазній реакції, та ініціює процес стимуляції фагоцитозу (НСТ-тест) – світлова мікроскопія. Спектрофотометричний метод – для визначення вмісту циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові щурів. Турбодиметричний метод – для визначення вмісту С3 фрагмента комплементу по співвідношенню оптичної щільності зразка і контрольної проби, імуноферментний аналіз для визначення вмісту імуноглобулінів класів А, М, G. Імунологічні дослідження проводили у діагностичній лабораторії з імуноферментним та імунофлуоресцентним аналізом ДУ "Інститут загальної та невідкладної хірургії ім. В.Т. Зайцева НАМН України". Свідоцтво про атестацію № 100-118/2012. Статистичні методи оцінки результатів.

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше при порівнянні імунологічних показників у контрольних груп тварин різного віку виявили відмінності кількісних змін показників вродженої ланки імунітету. Контрольні тварини двох вікових груп не відрізнялися показниками кисневонезалежного фагоцитозу. Контрольні тварини старшої групи порівняно з 3 місячними тваринами показали знижену активацію кисневозалежного фагоцитозу в НСТ дослідженні. У молодих контрольних тварин спостерігалось підвищення концентрації фактора опсонізації С3 фрагмента комплементу, що свідчить про наявність більш високої потенціальної реактивності в цій групі.

Уперше показано, що молоді й старі тварини після інфікування грамнегативними мікроорганізмами (*P. aeruginosa* і *E. coli*) обирають різну стратегію для процесингу бактеріальних антигенів. У тварин старшої групи після інфікування досліджуваними мікроорганізмами були більш виражені реакції кисневонезалежного й кисневозалежного фагоцитозу і С3 фрагмента комплементу.

Уперше показано, що при дослідженні ефектів різних інфекційних антигенів у двох групах спостерігали більш виражену локальну й системну запальну реакцію після введення *E. coli* порівняно із введенням *P. aeruginosa*.

Уперше показано, що на 5-ту добу експерименту після індукції запального процесу в експериментальних тварин різного віку була знижена концентрація Ig A, вочевидь за рахунок споживання його при системному запаленні. В ході дослідження виявили невеликі відмінності в кількісних характеристиках й динаміці зміни показників ЦІК з 3 по 7 добу бактеріальної контамінації між двома віковими групами тварин.

Уперше показано, що на тлі запального процесу, індукованого введенням *E. coli*, застосування імунокоректора П. через 24 години після введення інфекційного антигена в двох вікових групах експериментальних тварин достовірно збільшувалася активація гідролітичних ферментів лізосом при ендоцитозі антигенів та індекс стимуляції кисневозалежного фагоцитозу при участі НАДФ-Н, особливо на ранніх термінах запалення. Застосування імунокоректора превентивно до індукції запального процесу – *E. coli*, навпаки, викликало інгібування кисневозалежного фагоцитозу.

Уперше показано, що після застосування композитного препарату М. після дії патогена *E. coli* у тварин двох вікових груп спостерігали іншу реакцію – у вигляді стимуляції активності фагоцитозу та збільшення концентрації опонізуючого фактора – С3 фрагмента комплементу, що свідчить про наявність подібних рівнів реактивності і резистентності у двох вікових групах. Введення імунокоректора М. превентивно до інфікування *E. coli* у експериментальних тварин різного віку викликало різну реакцію. У молодих експериментальних тварин достовірно знижувалась активність фагоцитозу на 3 добу експерименту. В старшій віковій групі на тлі бактеріального зараження *E. coli* і введення М. відбувалася активація кисневозалежного фагоцитозу нейтрофілів протягом усього експерименту.

Показано, що досліджувані імунокоректори мають різні механізми впливу на експериментальних тварин залежно від віку тварин і термінів введення імунокоректорів на різних стадіях запалення. Отримані результати дозволяють обґрунтувати доцільність застосування досліджуваних імунокоректорів у залежності від стадії запального процесу та віку. Уперше було показано, що

основну характеристику імунної відповіді молодих тварин можна вважати їхню високу реактивність на чужорідні агенти, а у старих тварин, навпаки, виявили вищу резистентність до інфекційних антигенів при індукції запальної реакції.

Біоетична експертиза. Роботу з лабораторними тваринами (щурами) проводили відповідно до вимог положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та згідно відповідних Законів України. Комісією НДІ біології порушень при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено (протокол № 1 від 19.01.2017 р.)

Особистий внесок здобувача. Дисертант самостійно написав огляд літератури, розділ «Матеріали та методи». Дисертантом проведено інформаційний пошук даних наукової літератури за темою дисертаційної роботи. Проведено особисто експериментальні дослідження та їхню статистичну обробку. Підготовлено матеріали публікацій. Аналіз та інтерпретація одержаних результатів проведені спільно з науковим керівником, професором, д.б.н. Клімовою О. М.

Апробація результатів дисертації. Основні положення і результати роботи доповідалися на науково-практичних конференціях: міжнародна наукова конференція «Механізми функціонування фізіологічних систем», (Львів, 2014); міжнародна науково-практична конференція «Пріоритети сучасної медицини: теорія і практика», (Одеса, 2015); міжнародна науково-практична конференція «Актуальні питання боротьби з інфекційними захворюваннями», (Харків, 2015); міжвузівська конференція молодих вчених та студентів «Медицина третього тисячоліття», (Харків, 2015); 8th International Scientific Interdisciplinary Conference for medical students and young scientist. (Kharkiv, 2015); міжнародна науково-практична конференція з медицини «Медична наука і сучасність», (Київ, 2015); міжнародна науково-практична конференція «Нове і традиційне в дослідженнях сучасних представників медичної науки», (Львів, 2016).

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 3 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та 2 додатків. Обсяг

загального тексту дисертації складає 137 сторінок, з них основного тексту 96 сторінок. Робота ілюстрована 24 таблицями та 7 рисунками. Список використаних джерел містить 186 найменувань.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження, проведені в дисертаційній роботі, виконані в період з 2014 по 2017 рр. у рамках фрагмента теми планової наукової роботи кафедри мікробіології, вірусології та імунології ім. проф. Д. П. Гриньова Харківського національного медичного університету «Експериментальне мікробіологічне обґрунтування протимікробної терапії гнійно-запальних захворювань» (номер державної реєстрації теми 0114U003390). А також у рамках фрагмента теми НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна «Розробка теорії експериментальної регуляції тривалості онтогенезу» (номер державної реєстрації 0115U000486).

Практичне значення отриманих результатів. Матеріали цієї дисертаційної роботи можуть використовуватися в практиці при з'ясуванні імунологічного резерву організму різної вікової категорії під дією грам негативних збудників, які містять у своєму складі ліпополісахарид. Ці дослідження можуть бути використані для вибору імуномодуючих препаратів на різних етапах запального процесу з урахуванням вікових особливостей організму та розроблення методичних рекомендацій. Імунокоректор П. доцільно застосовувати після індукції запального процесу мікроорганізмами, оскільки він має виражену антиоксидантну активність. Композитний імунопрепарат М. краще застосовувати превентивно до індукції запалення через те, що цей препарат стимулює експресію генів прооксидантних ферментів. Матеріали цієї роботи впроваджені у науково-педагогічний процес кафедри мікробіології, вірусології та імунології ім. проф. Д. П. Гриньова, а також у спеціалізований курс «Лабораторна діагностика» у Харківському національному медичному університеті.

РОЗДІЛ 1

ПЕРВИННИЙ ВРОДЖЕНИЙ ТА ВТОРИННИЙ АДАПТИВНИЙ ІМУНІТЕТ НА ТЛІ ЗАПАЛЕННЯ (ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД)

1. 1 Формування та роль вродженої клітинної та гуморальної імунорезистентності

Імунна охорона внутрішнього середовища організму від чужорідних інфекційних і неінфекційних агентів здійснюється шляхом взаємодії багатьох клітинних та гуморальних факторів імунітету. Клітини імунної системи й гуморальні продукти їх життєдіяльності забезпечують вроджені та адаптивні реакції імунної системи [2, 13, 26].

Гуморальні вроджені фактори протиінфекційного захисту людини можуть самі мати антимікробні властивості або здатні активізувати інші гуморальні й клітинні механізми протиінфекційного імунітету [27, 87, 88, 117]. До гуморальних вроджених чинників протиінфекційного захисту відносяться білки системи комплементу, лізоцим, трансферин, С-реактивний білок, адаптерні білки та ін. [8, 68, 66, 92, 156]. Ці фактори розрізняються не тільки походженням, фізико-хімічними властивостями, швидкістю біосинтезу й катаболізму, а й активністю по відношенню до тих чи інших мікроорганізмів. Одні з них, наприклад, система комплементу, зазвичай не активні, але набувають імунологічну активність в результаті каскадної активації та взаємодії всіх вхідних у систему компонентів комплементу [180]. Інші (лізоцим) є ферментами, субстратами для яких служать певні хімічні структури клітинних стінок мікроорганізмів [167]. Треті (трансферин) конкурує з мікроорганізмами в боротьбі за важливі для останніх метаболіти, без яких мікроби не можуть розмножуватися [39]. Циркують у крові інтерферони, які, включаючись в клітини, підвищують стійкість клітини до цитопатичної дії вірусів, що перешкоджають їх розмноженню в клітинах. С-реактивний білок крові, утворюючи комплекси з полісахаридами

різного походження, активує систему комплементу, а також фагоцити й деякі популяції лімфоцитів крові [117, 185]. В результаті різні полісахаридні продукти деградації клітин швидко видаляються з крові, стимулюється цитотоксична активність лімфоцитів та зростає продукція імуноглобулінів [57,124,138].

До вроджених факторів імунітету відносяться природні кілери (NK-клітини) [112, 164], які представлені в організмі людини несенсибілізованими клітинами, що здійснюють незалежний від антитіл і комплементу лізис клітин-мішеней [106, 152]. Протягом тривалого часу вважали, що літична дія відносно клітин-мішеней є дуже важливою, але практично єдиною функцією природних кілерів у підтримці генетичного гомеостазу [76]. Подальші дослідження показали, що природні кілери мають не тільки ефекторну, але і регуляторну активність. Вони здатні посилювати проліферацію Т-лімфоцитів, стимулювати відповідь цитотоксичних Т-лімфоцитів людини на інфіковані вірусом аутологічні клітини, гальмувати антитілоутворення, регулювати гемопоез і гранулоцитопоез. Регуляторні функції природних кілерів опосередковуються, ймовірно, медіаторами, які виділяються в результаті їх мітогенної, бактеріальної або вірусної активації [147, 149].

Доведено продукція природними кілерами інтерлейкіну-1, інтерлейкіну-2, альфаінтерферонів і гаммаінтерферонів, фактора росту В-лімфоцитів, колоністимулюючого фактора [8, 146].

Вроджені клітинні та гуморальні механізми імунітету, взаємодіючи й доповнюючи один одного, забезпечують ранній та досить надійний захист організму від різноманітних збудників. При розвитку інфекції, викликаній високовірулентними мікроорганізмами, вроджені механізми протиінфекційного захисту доповнюються антиген-специфічними факторами імунітету [159].

У людини та вищих тварин набутий протягом життя імунітет обумовлений лімфоцитами, взаємодіючими в процесі імунної відповіді як один з одним, так і з допоміжними клітинами (макрофагами, дендритними клітинами лімфатичних вузлів). Імунна перебудова організму проявляється високою стійкістю його по відношенню до інфекції, накопиченням у крові антиген-специфічних лімфоцитів

й антитіл, формуванням підвищеної чутливості сповільненого типу й інших так званих «клітинних імунних реакцій» [97, 175].

Міграція стовбурових клітин у виличковій залозі та заселення посттимічних Т-лімфоцитів по периферичним лімфатичним органам особливо активно відбувається в ембріональному та ранньому постнатальному періодах розвитку організму, у дорослих ці процеси також відбуваються, але з віком їхня інтенсивність поступово знижується. Т-лімфоцитам в імунній відповіді відводиться виключно важлива роль, оскільки поряд з клітинами, що володіють ефекторними функціями і забезпечують клітинні реакції імунітету, серед Т-лімфоцитів виявлено субпопуляції клітин, що регулюють активність і навіть характер імунної відповіді (Т-лімфоцити-індуктори імунної відповіді, Т-хелпери, Т-супресори) [123, 128, 135]. Диференціюванню й дозріванню Т-лімфоцитів сприяють гормональні пептиди виличкової залози – тимозин, тимопоетин, Т-активін, тималін. Залишачи тимус лімфоцити відрізняються фенотипічно та мають маркери, характерні для тієї чи іншої субпопуляції Т-лімфоцитів [164, 171].

В-лімфоцити концентруються у вторинних лімфоїдних органах та мають здатність до рециркуляції. Вони є попередниками плазматичних клітин, які забезпечують гуморальну імунну відповідь організму та накопичення в крові антитіл різних класів і субкласів [133].

Таким чином, специфічна імунна відповідь організму визначається активністю взаємодії імунокомпетентних, фагоцитуючих клітин – макрофагів, антиген-специфічних клонів ефекторних і регуляторних Т- й В-лімфоцитів, диференціюванням В-лімфоцитів у плазматичні клітини, накопиченням антитілопродукуючих клітин та антитіл [108].

Згасання імунної відповіді супроводжується активацією Т-супресорів, а також В-лімфоцитів – попередників плазматичних клітин, що продукують антиідіотипічні антитіла. Частина накопичених в організмі Т- й В-лімфоцитів антиген-специфічних клонів перетворюються в малі лімфоцити, носії імунологічної пам'яті [146, 173].

При вродженому імунітеті імуноглобуліни класу М накопичуються в крові раніше антитіл інших класів, рівень яких зростає лише за зростання імунної відповіді. При згасанні імунної відповіді в організмі зберігаються антиген-специфічні малі Т- і В-лімфоцити – носії імунологічної пам'яті [127, 155].

Рівень вродженої резистентності крім вроджених дефектів визначається безліччю інших чинників (вік, стреси, харчування, добовий біоритм, пора року і так далі) [9].

Фактори вродженого імунітету забезпечують з одного боку бар'єрну функцію організму на ранніх етапах онтогенезу, і так само виконують роль індуктора реакцій адаптивного імунітету. Функціональний стан вроджених факторів вродженого імунітету залежить від видових генетичних особливостей, і так само від етапів взаємодії макроорганізму з інфекційними антигенами [36, 129]. У процесі онтогенезу макроорганізми зазнають багаторазову взаємодію з інфекційними патогенами, стресорними (хімічні й фізичні) й абіотичними факторами. Різноманітні типи взаємодії в процесі онтогенезу по-різному впливають на клітинну ланку вродженого імунітету та на експресію рецепторів, що забезпечують адгезію антигенів, і на активність внутрішньоклітинних ферментів, які беруть участь в процесингу (перетравлюванні) антигенів [101].

1. 1. 1 Фактор вродженого імунітету - фагоцитозу в забезпеченні резистентності від мікроорганізмів

Мечников І. І. вивчав процеси внутрішньоклітинного травлення в різних токсономічних групах тварин, людей та дійшов висновку, що це явище має загальний біологічний сенс в аспекті забезпечення захисних функцій від інфекційних антигенів [72]. І. І. Мечников так само приділяв особливу увагу функції пробіотиків кишечника поряд з фагоцитозом у попередженні процесів прискореного старіння [38].

Однак формування імунної відповіді в присутності інфекційних антигенів у залежності від віку, статі вивчені недостатньо. Існує думка, що при старінні

порушується функція ферментів забезпечуює різні біологічні процеси за епігіномних змін цих біологічних каталізаторів [21, 102, 177]. Багато ферментів можуть зазнавати конформаційні зміни, а тому й змінювати функціональні можливості.

Причиною розвитку імунозалежних захворювань та станів є збільшення кількості негативних факторів навколишнього середовища, широке застосування вакцин й сироваток, стресові ситуації, збільшення вантажу бактеріальних і вірусних інфекцій, способу життя [120, 122].

Понад сто років минуло з моменту відкриття фагоцитарної теорії лауреата Нобелівської премії І. І. Мечникова, який показав, що в організмі існує велика група клітин мезодермального поглинання, здатних поглинати та руйнувати мікроорганізми й старіючі клітини [72]. Уявлення Мечникова про роль фагоцитозу в боротьбі з різними антигенами отримало широкий розвиток у сучасній науці. Захоплення та перетравлення мікроорганізмів здійснюється двома типами клітин, мікро- і макрофагами.

Мікрофаги – нейтрофіл, короткоживуча клітина. Локалізація: кров (основна) та осередки гострого запалення. Мають 3 типи гранул: первинні азурофільні гранули (мієлопероксидаза, лізоцим і набір катіонних білків); вторинні «специфічні» гранули (лактоферин, лізоцим, білок, що зв'язує вітамін В12); третинні гранули (схожі на звичайні лізосоми – містять кислі гідролази).

Макрофаги (МФ) утворюються з промоцітов кісткового мозку, які після диференціювання в моноцитах крові, зрештою, затримуються в тканинах у вигляді зрілих макрофагів, де й формується система моноклеарних фагоцитів (СМФ: гістіоцити сполучної тканини, клітини Купфера, мікроглія, *МФ* лімфатичних вузлів, альвеолярні *МФ*, остеокласти, *МФ* селезінки, синовіальні *МФ*, мезангіальні клітини ниркових клубочків) [6]. Знищення мікробного агента відбувається завдяки кисневозалежним і кисневонезалежним механізмам. З того моменту, коли ініціюється фагоцитоз, відбувається різка активація гексозомонофосфатного шунта, що генерує НАДФН [119, 141]. НАДФН використовується для відновлення молекулярного кисню, пов'язаного з сук b-245

(міститься тільки в фагоцитуючих клітинах). Це викликає бурхливе споживання кисню та відбувається «кисневий вибух».

Відомо, що нейтрофіли забезпечують вроджений імунний захист організму, тобто реалізують свій активний потенціал для підтримки гомеостазу [116]. Фагоцитуючі клітини забезпечують інактивацію або деградацію різних антигенів та лігандів за допомогою активованих форм кисню й ферментів [121].

Фагоцитуючі клітини розпізнають антиген за допомогою поверхневих рецепторів для імуноглобулінів (FcR) і фрагментів системи комплементу (CR3), та при взаємодії рецепторів з антигенами також несуть рецептори антигенів комплексу гістосумісності II класу.

Ключовою функцією фагоцитів є процес ендоцитозу, який включає наступні етапи: приєднання мішені, виведення мішені в плазматичну мембрану, індукцію інтегринов CD11b / CD18 та залучення опсонізованих IgG за допомогою Fcγ-рецептора [133, 172].

Крім ендоцитозу, існує так званий екзоцитоз, регульований актиновим цитоскелетом фагоцитів та іонами кальцію в цитозолі, який визначається дегрануляцією фагоцитів, гранули яких містять лізосомальні гідролази, лактоферин, лізоцим.

При бактеріальній контамінації організму фагоцитуючі клітини й білки системи комплементу активізуються власними зміненими інфікованими клітинами. На цьому тлі може посилюватися утворення активованих форм кисню, вироблення прозапальних цитокінів або навпаки протизапальних цитокінів (інтерлейкіну - 10) [7, 8].

Фагоцити направлено переміщуються до об'єкта фагоцитозу антигена, реагуючи на хемоатрактанти: речовини мікробів, активовані компонентами комплементу (C5a, C3a) й цитокінами. Плазмалема фагоцитів охоплює бактерії або інші корпускули та власні пошкоджені клітини. Потім об'єкт фагоцитозу оточується плазмалемою й мембраною везикули (фагосома), занурюється в цитоплазму фагоцитів. Мембрана фагосоми зливається з лізосомою та фагоцитований мікроб руйнується, рН закисляється до 4,5; активуються ферменти

лізосоми. Фагоцитований мікроб руйнується під дією ферментів лізосом, катіонних білків дефенсинів, катепсину G, лізоциму та інших чинників. При окислювальному (дихальному) вибуху в фагоциті утворюються токсичні антимікробні форми кисню – перекис водню H_2O_2 , супероксиданіон O_2^- -гідроксильний радикал $OH^\cdot$, синглетний кисень. Крім цього антимікробну дію мають окис азоту й радикал $NO^\cdot$. Макрофаги виконують захисну функцію ще до взаємодії з іншими імунокомпетентними клітинами (врожена резистентність).

У самому процесі фагоцитозу виділяють наступні основні етапи [62, 83]:

- індукція хемоатрактантами міграції в запальний осередок нейтрофілів і моноцитів (процес хемотаксису);
- прилипання мікробів до нейтрофілів, яке в основному є ліганд-рецепторною взаємодією, що призводить до активації клітини;
- поглинання мікроба, яке здійснюється актиноміозиновим цитоскелетом, що веде до утворення фагосоми;
- дегрануляція, тобто викид мікробіцидного вмісту азурофільних і специфічних гранул у фагосому з утворенням фаголізосоми;
- кисневий вибух, що полягає в утворенні мікробіцидних форм кисню;
- загибель мікроба в фаголізосомах за рахунок кисневозалежного і кисневонезалежного механізмів;
- деградація лізосомальними гідролазами мікроба;
- екзоцитоз, що полягає в відновленні порушеної мембрани нейтрофілів за рахунок мембран специфічних гранул і секреторних везикул та викиду їхнього вмісту в навколишнє середовище; останнім може надавати руйнівну дію на органи та тканини господаря;
- апоптоз нейтрофілів і видалення їх макрофагами має велике значення для захисту тканин і органів господаря від шкідливої дії їх лізосомальних ферментів.

Розрізняють чотири основні стадії фагоцитозу:

- Хемотаксис – просування фагоцитів до об'єкта фагоцитозу, здійснюється за допомогою псевдоподій.

- Адгезія (прикріплення). На мембрані фагоцитів розміщені різні рецептори для захоплення мікроорганізмів.
- Ендоцитоз (поглинання). Принципи поглинання бактерій ідентичні таким у амеб: захоплені частинки занурюються в протоплазму та в результаті утворюється фагосома до укладеного всередині об'єкта.
- Внутрішньоклітинне перетравлення. До фагосоми спрямовуються лізосоми, потім оболонки фагосоми й лізосоми зливаються та ферменти лізосом виливаються в фаголізосому.

Як відомо, головну роль в процесі поглинання опсонізованих фагоцитами мікробів грають рецептори, що розпізнають Fc-фрагмент Ig G (FcγR) та фрагменти C3-компонента комплементу (CR3 або CD11b / CD18). Фагоцитовані мікроорганізми піддаються також комплексу різних мікробіцидних факторів [33].

Підвищенню фагоцитарної активності нейтрофілів сприяють деякі чинники вродженої та адаптивної природи (іmunні антитіла, комплемент, пропердин, лізоцим). Існує думка, що фагоцитуючі нейтрофіли в поєднанні з пропердином здійснюють первинний захист макроорганізму від чужорідних антигенних подразників до формування істинної вродженої імунологічної реакції організму. Однак не існує прямої залежності між збільшенням числа лейкоцитів та їхньої фагоцитарної активності [37, 148, 158].

Інтерес представляє реакція первинних вроджених факторів імунітету (фагоцитозу) в експериментальних тварин різного віку, оскільки в процесі онтогенезу дорослі організми зазнають постійні контакти з антигенами різної природи, в тому числі й інфекційними.

1. 1. 2 Система комплементу

Система комплементу являє собою вроджену гуморальну ланку імунітету.

Це багатофункціональна система захистних білків сироватки крові, яка залишається неактивною, якщо людина перебуває у нормальному стані.

Систему комплементу активують певні структури патогенів чи їх комплекси з антитілами. Після активації вона функціонує як мультиферментний каскад, у якому продукт однієї реакції ініціює більш потужну наступну літичну реакцію. Система комплементу містить понад 30 компонентів (фракцій). Їх поділяють на :

1. Власне сироваткові білки комплементу, які позначаються як компоненти C1-C9, В та деякі інші;
2. Мембранні рецептори до компонентів комплементу (CRI-CRIV);
3. Регулятори активності комплементу (C1-інгібітор, фактор Н, що інактивує C3b шляхом його розщеплення на фрагменти C3c і C3d, та фактор І, який інактивує C3 b і C4 b).

Білки системи комплементу є глобулінами, які мають субодиничний склад. Гепатоцити й макрофаги синтезують більшість із них. Решту продукують клітини селезінки, кишечника, кісткового мозку, лімфоїдної тканини та епітелію. Існують три основні шляхи активації комплементу: класичний, альтернативний та лектиновий [166].

Вони мають різні пускові механізми й починаються з активації різних компонентів системи комплементу, але зрештою утворюють однакові кінцеві продукти. У кожному шляху активація комплементу здійснюється завдяки протеолітичному розщепленню біологічно інертних білків з великою молекулярною масою. Це супроводжується утворенням фрагментів, які звичайно позначаються додатковими літерами: «а», що характеризує малий розчинний пептид, та «b» - позначає великий поліпептид, який може зв'язуватися з поверхнею клітин. Продукти розщеплення різних компонентів комплементу об'єднуються у комплекси й формують нові активні ферменти, які зветься «конвертазами».

Класичний шлях активації комплементу ініціюється утворенням імунного комплексу «антиген (АГ) – антитіло (АТ)», в якому беруть участь тільки IgG та IgM. Безпосередня активація комплементу індивідуальним антигеном чи антитілами у такий спосіб неможлива. Взаємодія антитіл з антигеном дозволяє

імуноглобулінам приєднуватися до компоненту C1, який містить C1q, C1s та дві C1r субодиниці. У присутності іонів Ca^{++} субодиниця C1q перехресно зв'язується з двома чи більшим числом змінених Fc-фрагментів суміжних молекул антитіл. У результаті послідовно активуються C1r і C1s субодиниці та формується комплекс АГ-АТ-C1qrs, який має естеразну активність. Він розщеплює C2 і C4 компоненти комплементу на фрагменти: C4b, який зв'язується з поверхнею клітини-мішені, C4a і C2b (вивільняються до плазми крові) та C2a, який приєднується до C4b. Комплекс C4b2a є активним ферментом й зветься C3-конвертазою, через те що розщеплює C3-компонент комплементу на фрагменти C3a і C3b. Взаємодія C3b з C4b2a утворює новий фермент C4b2a3b, чи C5-конвертазу, яка розщеплює C5 на фрагменти C5a і C5b. Пептиди C5a, C3a та C4a є анафілотоксинами, які викликають дегрануляцію опасистих клітин і базофілів крові [150, 182]. Це призводить до вивільнення медіаторів запалення та підвищення судинної проникності, вазодилатації та скорочення гладкої мускулатури. C5a також є хемоатрактантом для нейтрофілів. Фрагмент C5b бере участь у формуванні кінцевого продукту активації комплементу мембраноатакуючого комплексу (МАК). Фрагмент C5b формує комплекс з C6, C7 та C8, що заглиблюється в ліпідний бішар цитоплазматичної мембрани клітини-мішені. Комплекс зв'язує декілька молекул C9, які вбудовуються у мембрану клітини та утворюють стінки трансмембранного каналу (патологічної пори). Цей канал становить основний елемент літичного МАК. Він проникний для електролітів (Na^+) та води. Через канал МАК до цитоплазми надходить вода, що призводить до осмотичного лізису вірус-інфікованої або пухлинної клітини-мішені. Бактерії гинуть у результаті осмотичного лізису та порушення іонної асиметрії між внутрішньо- й позаклітинним середовищем, що необхідно для генерування енергії та трансмембранного перенесення речовин [136, 153].

Альтернативний шлях активується безпосередньо компонентами поверхневих структур мікроорганізмів (ліпополісахаридами, полісахаридами бактерій та грибів, вірусними білками), не пов'язаний з IgG чи IgM (IgA може ініціювати цей шлях) і не містить C1, C2 та C4. Для його здійснення необхідні

сироваткові фактори В, D і Р, що належать до так званої пропердинової системи. У присутності іонів Mg^{++} він взаємодіє з фактором В й утворює комплекс C3bB. Фактор В, що міститься у цьому комплексі, у подальшому розщеплюється на фрагменти Ba й Bb за допомогою сироваткової протеази – фактора D. Стабілізована пропердином C3–конвертаза (Р - C3bBb) розщеплює C3, внаслідок чого формується C5–конвертаза альтернативного шляху – C3bBb3b. Далі розщеплюється компонент C5 та утворюється МАК, так само як при реалізації класичного шляху активації комплементу.

Лектиновий шлях активації комплементу здійснюється за рахунок лектинів, які є білками, що зв'язують вуглеводи клітинних стінок бактерій. До лектинів належить манозозв'язуючий протеїн сироватки крові, який відіграє таку ж саму роль, що й субодинаця C1q. Після приєднання до бактерії він активує манозозв'язуючу протеїн-асоційовану серинову протеазу, яка розщеплює C2 і C4 компоненти комплементу. Це приводить до утворення C3-конвертази та подальшого розгортання каскадної реакції активації комплементу, яка завершується формуванням МАК [107, 142].

Найважливішими біологічними ефектами комплементу є:

- 1) опсонізація (стимуляція фагоцитозу). Фрагмент C3 системи комплементу є головним опсоніном фагоцитозу;
- 2) хемотаксис – C3a і C5a сприяє надходженню нейтрофілів, еозинофілів і моноцитів до вогнища запалення;
- 3) адгезія нейтрофілів до клітин ендотелію посилюється фрагментом C5a;
- 4) анафілотоксини (C3a, C4a і C5a) викликають вивільнення гістаміну, розвиток гіперемії, гіпертермії та набряку тканин;
- 5) цитоліз – вбудова МАК у мембрани клітин-мішеней призводить до лізису бактерій, еритроцитів, вірус-інфікованих й пухлинних клітин;
- 6) пряма противірусна дія – певні компоненти комплементу здатні перешкоджати пенетрації деяких вірусів у клітини;
- 7) посилення продукції антитіл у результаті зв'язування C3b з CR1I рецептором В-лімфоцитів.

1. 2 Адаптивний імунітет при старінні

Координація метаболічних змін на надклітинному та органному рівнях контролюється трьома регуляторними системами організму – нервовою, ендокринною та імунною. Роль імунної системи в старінні досить важлива, що навіть призвела в минулому до створення кількох імунних теорій старіння, які намагалися пояснити всі явища старіння в термінах мутацій в імунній системі [1, 21]. Проте, дотепер отримано порівняно мало даних у цьому аспекті. Роль імунної системи в розвитку адаптації та її взаємодії з нервовою й ендокринною системами залишається маловивченою сферою молекулярної біології та біохімії [110, 161].

Найбільші зміни зазнають компенсаторно-приспосувальні механізми, в основі яких лежить зниження окисно-відновних процесів. Внаслідок порушень механізму згортання крові і фібринолізу спостерігається схильність до тромбозів. Поступово розвивається й прогресує зниження активності метаболічних процесів та імунологічної реактивності, що визначається кількісним дефіцитом клітин-попередників, зменшенням міграції стовбурових елементів і кооперації Т- і В-лімфоцитів [98, 168].

Спостерігається дефіцит не тільки Т-ефекторів й Т-помічників, але й Т-супресорів Т- і В-ряду. Значні зміни виникають в шлунково-кишковому тракті, де внаслідок атрофічних процесів відбуваються зменшення активності секреторного апарату, ослаблення моторики різних його відділів [151].

В кінці XIX століття І. І. Мечников показав, що підвищення клітинного імунітету сприяє збільшенню тривалості життя. Він розробив фагоцитарну теорію імунітету та вважав, що в самому організмі людини закладені можливості, що дозволяють успішно боротися з патологічною старістю [72]. У 1908 р. він був удостоєний Нобелівської премії з фізіології та медицини спільно з П. Ерліхом. І тільки через століття П. Догерті й Р. Цинкернагель виконали детальні дослідження специфічності клітинного імунітету при вірусної інфекції (Нобелівська премія з фізіології та медицини в 1996 р.) [77].

Експериментальні та клінічні дослідження в геронтології показали, що імунний захист організму є першою системною функцією, яка порушується при старінні [14, 15, 16]. Пептидні екстракти тимуса й пептиди, виділені з цих екстрактів, були першими препаратами, запропонованими для корекції імунодефіцитного стану.

В останнє десятиліття досягнення в теоретичній та практичній геронтології дозволило здійснити цілеспрямовану регуляцію вікових змін [86, 181]. Виходячи з цього, одним із пріоритетних завдань сучасної геронтології є профілактика прискорення старіння та вікової патології, спрямована на збільшення середньої тривалості життя, збереження активного довголіття та досягнення видової межі життя людини [143, 160].

З віком в ендокринній системі порушується продукція статевих гормонів, змінюються значення показників стану імунної системи: знижується рівень імунної відповіді, порушується здатність лімфоцитів в передачі внутрішньоклітинних сигналів, знижується різноманітність репертуару Т-клітинних рецепторів. Відомо, що ці процеси взаємопов'язані, тому що стероїди впливають на функціональні показники стану імунної системи та імунокомпетентних клітин [82, 104, 113].

Показники вродженого імунітету (система комплементу, вміст сироваткового лізоциму, НСТ-тесту, рівень глікогену в нейтрофілах та інші) мають вікову залежність та знаходиться під контролем імунонейроендокринної регуляції [125]. Молоді й старі організми краще використовують різні стратегії адаптацій до діючих стрес-факторів [18, 62]. У старих організмів краще сформований вторинний адаптивний імунітет, що супроводжується синтезом імунологічних антитіл.

Недостатня увага приділена віковим розбіжностям адаптаційних можливостей організму. Отримані дані про зміни метаболічного стану, рівня експресії генів, функції імунної та нейроендокринної систем при старінні змушують припустити наявність різної здатності до адаптації молодих й старих організмів [109, 178]. За результатами експериментів, присвячених вивченню

адаптаційних можливостей тварин різного віку, В. В. Фролькісом запропонована та розроблена теорія старіння, яка розкриває внутрішньо суперечливий характер вікового розвитку [95]. Відповідно до цієї теорії віковий розвиток і тривалість життя визначаються балансом двох процесів: поряд зі старінням – процесом руйнівним – розгортається процес антистаріння (вітаукт). Цей процес, за Фролькісом, спрямований на підтримку життєздатності організму, його адаптацію, збільшення тривалості життя.

Тварини різного віку у відповідь на дію інфекції по-різному змінюють інтенсивність й спрямованість метаболічних реакцій [22]. Однак дотепер не ясні причини цих відмінностей. Можливо, що відповідь на це питання допоможе не тільки зрозуміти молекулярні механізми формування адаптивних пристосувань, але прояснити причини старіння організмів [38].

Дійсно, зі збільшенням віку відповідні реакції організму на інфекційні впливи відрізняються від таких у молодих організмів, однак це не завжди слід трактувати як зниження адаптаційного потенціалу. Найімовірніше, з віком змінюється стратегія адаптації, а не здатність організму до неї [162]. Принципово важливо визначити, чи дійсно відбувається «втрата» адаптаційного потенціалу з віком або ж він, цей потенціал, з якихось причин не використовується організмом старих тварин. Для вирішення цього питання автори досліджували пов'язані з часом характеристики адаптації до комплексу факторів середовища у молодих та дорослих тварин. Виявили, що відповідна реакція досліджуваних ферментів на послідовні багаторазові впливи стрес-чинників залежать не від віку як такого, а від накопиченої організмом у процесі адаптації метаболічної пам'яті, і в цьому сенсі онтогенез може бути представлений як результат адаптаціогенеза [184].

Метаболічна пам'ять може по-різному модифікувати відповідь системи на подальший вплив. Можна виділити три типи метаболічної модифікаційної відповіді на наступні стрес-фактори: збереження відповіді незмінною (прояв метаболічної пам'яті), формування нової «парадоксальної» відповіді на первинний вплив та прояв суперактивації метаболічної системи [170].

1. 2. 1 Класи імуноглобулінів

Антитіла синтезуються в організмі клонами плазматичних клітин. Утворення антитіл є результатом міжклітинної взаємодії, що виникає під впливом антигенного стимулу. У клітинній кооперації беруть участь три типи клітин: макрофаги (А-клітини), лімфоцити тимусного походження (Т-лімфоцити) і лімфоцити кістковомозкового походження (В-лімфотици) [183]. Т- і В-лімфоцити мають на своїй поверхні генетично детерміновані рецептори для антигенів найрізноманітнішої специфічності. Таким чином, розпізнавання антигена зводиться до відбору (селекції) клонів Т- і В-лімфоцитів, що несуть рецептори цієї специфічності [91, 117].

Молекули імуноглобулінів також як й комплемент є опсонінами, беруть участь в процесі опсонізації, зв'язуючись через фрагмент Fab з антигеном, а фрагмент Fc взаємодіє зі специфічними рецепторами фагоцитів [165].

Імуноглобуліни відносяться до поліфункціональних білків і реалізують такі основні функції: 1) специфічно розпізнають найрізноманітніші антигени й гаптогени; 2) взаємодіють з іншими імунокомпетентними клітинами, що відповідають їхнім рецепторам; 3) активують систему комплементу. Структури, відповідальні за різні функції імуноглобулінів, розташовуються на різних ділянках молекул цих білків. На цей час відомо п'ять основних класів імуноглобулінів: IgA, IgM, IgG, IgE і IgD [108]. Синтез імуноглобулінів, здійснюваний В-лімфоцитами, безпосередньо з дією будь-якого антигена не пов'язаний. Так, в організмі ще до появи будь-якого антигена існують клони В-лімфоцитів, здатні продукувати різноманітні за специфічністю імуноглобуліни. Синтез імуноглобулінів відбувається постійно і в певній мірі не залежить від дії конкретного антигена [3, 68].

Молекулярна маса IgG (мономер) дорівнює 150 000, константа седиментації 7 S. IgG є найпоширенішими імуноглобулінами. Їх концентрація у крові досягає 15 мг/мл (1,5 %). IgG свідчить про перенесену інфекцію, хронічну інфекцію або поствакцинальний імунітет. IgG беруть участь у реакціях лізису, оскільки вони

зв'язують комплмент, хоча й слабкіше, ніж IgM. Імуноглобуліни G проникають через плаценту і виявляються в жіночому молоці [133].

Імуноглобуліни M (пентамер) інакше називають макроглобулінами, оскільки їх молекули є агрегатами з п'яти первинних тетраполіпептидних молекул, що мають таку ж первинну структуру, як і у всіх інших імуноглобулінів. Молекулярна маса IgM дорівнює 900 000-1000 000, константа седиментації – 19 S, вміст їх у крові до 2 мг/мл. IgM з'являються у крові в гостру фазу запального процесу. IgM мають найвищу здатність зв'язувати комплемент. Через більші розміри молекули IgM циркулюють в основному у крові, не проникаючи в тканини та не сорбуючись на клітинах [132].

Молекулярна маса IgA – секреторного дорівнює 160 000. Але молекули звичайно поєднуються по дві (димер), утворюючи укрупнені молекули імуноглобуліну з молекулярною масою 370 000. Концентрація в крові IgA-3,9 мг/мл. У біологічних секретах IgA є основним імуноглобуліном, його призначення – захисна функція слизових оболонок. Секреторний IgA присутній практично завжди в вигляді димеру. У ньому є секреторний компонент у вигляді глікопротеїну [183].

Молекулярна маса IgD (мономер) дорівнює 150 000, у крові він утримується в концентрації 0,03 мг/мл. Цей імуноглобулін найменш вивчений і являє собою рецептор на В-лімфоцитах. IgE (мономер) з молекулярною вагою – 190 000 ідентифікований як реагін. Він з'являється в організмі при алергічних реакціях.

1. 2. 2 Циркулюючі імунні комплекси

Відомо, що пошкодження тканин при інфекційних хворобах може бути обумовлено двома основними причинами: внаслідок виділення токсичних речовин самими збудниками хвороб або при утворенні імунних комплексів (ІК), які тривалий час циркулюють в кровотоці і здатні відкладатися в окремих органах і тканинах, викликаючи місцеві запальні реакції [3]. Крім того, деякі віруси й

бактерії здатні індукувати поліклональний синтез антитіл, що сприяють утворенню *in vivo* ідіотипів-антиідіотипічних ІК.

Утворення комплексу антиген-антитіло є динамічним процесом, що постійно відбивається в організмі. Всі екзо й ендогенні антигени, які діють з рецепторами клітин імунокомпетентних систем і викликають синтез антитіл, є індукторами, що утворюють ІК. У кровоносному руслі постійно присутній широкий спектр ЦК з різними структурними та біологічними властивостями. ІК – компонент нормальної імунної відповіді. Досі невідомо, чи є підвищення кількості ІК причиною або наслідком імунокомплексного захворювання [169].

Особливе значення в регуляції імунної відповіді відводиться ідіотип-антиідіотипічним ЦК, здатним специфічно регулювати імунну відповідь.

Крім клітин крові, ЦК взаємодіють з клітинами різних тканин, що несуть Fc-, C1, C4, C5 і C3-рецептори (клітини епітелію, ендотелію, фібробласти та ін.), викликаючи зміни їх функціональної активності. Наприклад, при низьких концентраціях ЦК підсилюють, а при високих – пригнічують проліферацію фібробластів.

ЦК виступають як агенти, що беруть участь в регуляції імунної відповіді та підтримці зв'язку між імунною системою й іншими регуляторними системами організму, і спрямовані на його захист. ІК можуть проявляти патогенні властивості тільки в тому випадку, коли порушуються ці взаємозв'язки. Згідно теорії Р.В. Петрова про єдність взаємозв'язку всіх ланок імунної системи, імунокомплексні хвороби можуть розцінюватися як значне порушення взаємозв'язку між окремими ланками імунітету, що призводить до дисбалансу функціональної діяльності імунної відповіді [145].

1. 3 Порушення клітинної і гуморальної імунорезистентності

Фізіологічна функція фагоцитів, як і всі процеси живих організмів, носять мінливий характер [105]. Фізіологія вивчає метаболічні й імунофізіологічні параметри індивідів різного віку, а також рівень змін загальної резистентності під

дією факторів середовища. Важливу роль в пригніченні фагоцитарного процесу грають токсичні продукти, що виробляються інфікованими клітинами [130]. Ферменти мієлопероксидаза й глюкозо-6-фосфат дегідрогеназа, які ведуть до зниження утворення активних форм кисню і внутрішньоклітинного кілінга бактерій пригнічують фагоцитарний процес. Антигенний вантаж в онтогенезі є фактором порушення метаболічних процесів та резистентності до патогенів [176]. Через вплив антигенів та їхніх токсинів фагоцити можуть позбутися здатності виконувати свої функції. Функція імунної системи схильна до динамічних змін у часі. Факти вказують на зниження ефективності функціонування імунної системи зі збільшенням віку, в результаті чого зростає в десятки і сотні разів захворюваність й смертність від інфекційних хвороб [174]. З віком ефективність роботи імунної системи знижується, але різні ланки імунореактивності при старінні порушуються в різному ступені [95]. На цьому тлі формуються певні патерни імунних реакцій вродженого та адаптивного імунітету. Первинна імунна відповідь реалізується при першому контакті з незнайомим антигеном, а вторинний – при повторному. Вторинний імунітет більш досконалий, тому що здійснюється на якісно вищому рівні через наявність преформованих імунних факторів, що відбивають генетичну адаптацію до патогена [151].

Порушення у функціонуванні імунної системи можуть бути наслідком різних фізіологічних змін, які супроводжуються зрушеннями імунітету, що зачіпають практично всі його ланки [74]. Процес може посилюватися тим, що в вогнище запалення спрямовуються фагоцитуючі та інші клітини запалення, які поглинають комплекси, самі після цього часто руйнуються, звільняючи свої лізосомальні ферменти [83]. Зміна білково-ліпідно-вуглеводного обміну, робота медіаторних систем та імунологічні порушення зачіпають фактори вродженої резистентності (активність білків системи комплементу), гуморальні (концентрація імуноглобулінів, циркулюючих імунних комплексів – продуктів взаємодії антигена, антитіла й білкі системи комплементу, пептиди середньої молекулярної маси, лімфоцитотоксичність) і Т-клітинні реакції, що призводить до утворення цитотоксичних сполук [65, 138].

Активність фагоцитозу може знижуватися під дією гліколітичної отрути – монойодацетату, що порушує вироблення енергії в лейкоцитах, мікробних токсинів, що призводить до незавершеного фагоцитозу [148, 154]. Фагоцитарна активність деяких ферментів у лейкоцитах різко знижена при лейкозі, при імунній недостатності та дефіциті комплементу, тому що в нормі антитіла й комплемент стимулюють фагоцитоз [135].

Зміни системи комплементу теж бувають спадковими й набутими. Може статися блокада синтезу будь-якого з його компонентів. При дефіциті C1 сироватка втрачає бактерицидність. Розвиваються повторні інфекції верхніх дихальних шляхів, отит, ураження суглобів та хронічний гломерулонефрит, що нерідко призводять до смерті. Цей дефіцит успадковується за аутосомною ознакою.

Дефіцит C2 призводить до зниження бактерицидності сироватки, повертає вірусні інфекцій, дифузні хвороби сполучної тканини, гломерулонефрити й тромбоцитопенії. Компонент C3 є ключовим у формуванні ферментних і регуляторних властивостей комплементу. Синтез C3 визначається двома алельними генами як кодомінантна ознака; при відсутності одного з генів кількість C3 в крові знижується в 2 рази. При дефіциті C3 спостерігається висока смертність [182].

1. 4 Механізм взаємодії антигена з макроорганізмом

Розвиток імунної реакції гуморального та клітинного типу починається з проникнення антигена в організм та взаємодії з ним імунокомпетентних клітин. Завершується імунна реакція елімінацією антигена, який викликав реакцію, або відторгненням трансплантата.

Антиген може потрапляти в організм через різні бар'єрні тканини організму: шкіру, слизові оболонки шлунково-кишкового і уrogenітального трактів, дихальні шляхи та інші органи й тканини [9]. При попаданні антигена в м'які тканини організму або при його підшкірному введенні концентрація антигена

відзначається в регіональних лімфовузлах. Антиген, який потрапив у верхні дихальні шляхи або кишечник, концентрується в лімфоїдній тканині, асоційованій із слизовими оболонками. При попаданні антигена безпосередньо в кров концентрація його відзначається в селезінці. У місці концентрації антигена, головним чином, і відбуваються всі клітинні дії, пов'язані з розвитком імунної реакції. Разом з цим, імунний процес, який розвивається, як правило, носить генералізований характер, зачіпає, незалежно від місця локалізації антигена, також віддалені лімфовузли й селезінку та має відгомін в центральних органах імунітету. Пов'язано це з тим, що лімфоїдні клітини постійно циркулюють між усіма лімфоїдними органами і тканинами [11, 26, 67].

Шлях зараження антигенами є важливим фактором. При пероральному шляху зараження мікроорганізми потрапляють в слизову носоглотки й стравоходу та у відповідь виникає вроджений клітинний імунітет в ролі нейтрофілів [23]. При введенні *E. coli* через ін'єкції мікроорганізми потрапляють в стерильну черевну порожнину та посилюється фагоцитоз і бактерицидна активність. При введенні *P. aeruginosa* відбувається істотне обтяження інфекційного процесу, пов'язане з більшою токсичністю цього мікроорганізму [36].

Після проникнення в організм, бактерії прикріплюються до тканин за рахунок адгезинів, які мають відповідні ліганди. У цей період бактерії знаходяться в лаг-фазі, яка триває перші 4 години до початку періоду розмноження [39, 70]. Уже в цій стадії бактерії можуть елімінувати з первинного вогнища запалення через лімфатичні кровоносні судини [75]. Елімінація припиняється приблизно через 5 год через те, що бактерії порушують лімфо й кровообіг у мікросудинах. Паралельно посилюється проникність мікросудин, що призводить до екстравазації лейкоцитів (нейтрофілів) вже через одну год. [140].

Наступний період інфекційного процесу залежить від дози бактерій, швидкості розмноження та вірулентності. При низькій заражаючій дозі передіснуючі фактори місцевого захисту цілком у змозі реалізувати свій бактерицидний потенціал, що призводить до загибелі до 8 тисяч мікробів у перші

24 години без розвитку клінічних симптомів генералізації процесу. В іншому випадку розмножуючись мікроби можуть придушити активність фагоцитів за рахунок виснаження опсонінів. При локалізації концентрації мікробів вище 1×10^5 колонієутворюючих одиниць ймовірність розвитку сепсису різко збільшується. Це проходить на тлі гіперстимуляції спочатку клітин первинного вогнища запалення, а потім і лейкоцитів периферичної крові [85].

У розвитку імунної реакції як гуморального, так і клітинного типу, розрізняють: 1) аферентний етап; 2) центральний етап; 3) еферентний етап [96].

На аферентному етапі відбувається розпізнавання патогена антигенпрезентуючими клітинами (макрофагами, дендритними клітинами, В-лімфоцитами), його поглинання, процесинг антигена і його презентація в імуногенній формі. На цьому етапі відзначається посилення міграції імунокомпетентних клітин у зону концентрації антигена.

Центральний етап характеризується розвитком реакцій міжклітинних взаємодій, проліферацією та диференціюванням клоноспецифічних Т- і В-лімфоцитів, формуванням ефекторних клітин та клітин імунної «пам'яті». При розвитку гуморальної імунної реакції утворюються плазматичні клітини – продуценти антитіл, при розвитку клітинного імунітету – цитотоксичні ефекторні клітини [131].

У період *еферентного етапу* відбувається реалізація імунної реакції, яка проявляється в знищенні клітин-мішеней (чужорідних клітин; клітин, уражених патогенами) цитотоксичними лімфоцитами й макрофагами або нейтралізація розчиненого антигена, лізис позаклітинних бактерій специфічними антитілами [158].

Імунна відповідь буває двох видів: 1) первинна імунна відповідь; 2) вторинна імунна відповідь.

На первинне потрапляння антигена розвивається первинна імунна відповідь, на повторне потрапляння цього ж антигена розвивається вторинна імунна відповідь, яка характеризується більш ранньою і сильнішою відповідною імунною реакцією. Так, при розвитку первинної імунної реакції на гетерогенні еритроцити

максимальне накопичення в крові антиеритроцитарних антитіл спостерігаються на 10–12-ту добу, на шкірний трансплантат максимальне накопичення клітин-ефекторів відбувається на 9–11-ту добу [139].

При розвитку вторинної імунної реакції пік імунної відповіді на еритроцити та шкірний трансплантат розвивається на 5–7-у добу, при цьому утворення антитіл та цитотоксичних клітин відбувається в значно більшій кількості [91]. Центральна роль у розвитку вторинної імунної відповіді належить імунній «пам'яті». Під імунною пам'яттю мають на увазі здатність організму розвивати імунну відповідь по вторинному типу. Імунна пам'ять до одних антигенів зберігається протягом місяців, до інших – роками, до третіх – протягом усього життя.

Носіями імунної пам'яті для клітинного імунітету є Т-клітини «пам'яті», для гуморального імунітету – Т- і В-клітини «пам'яті», які формуються в процесі розвитку первинної імунної відповіді відповідно з антигенстимулюючими попередниками цитотоксичних Т-клітин, антигенстимулюючих Т-хелперів та антигеніндукуючих IgG + - В-клітин. Т- і В-клітин «пам'яті» мають морфологію малих лімфоцитів, здатних зберігатись в лімфоїдних органах протягом багатьох років [169].

Першою та обов'язковою умовою розвитку будь-якої імунної реакції є розпізнавання антигена. Розпізнавання антигена забезпечується як розчиненими молекулами, так і молекулами (рецепторами), вбудованими в мембрану клітин [163].

У розпізнаванні мікробних продуктів беруть участь такі молекули, які знаходяться в рідкому середовищі організму, як ЛПС-зв'язуючий протеїн, С-реактивний білок, С1q компонент комплементу, а також природні та імунні антитіла.

Для «хвостів» цих молекул на мембранах фагоцитів є спеціальні рецептори, які забезпечують поглинання патогена та подальший його процесинг і презентацію в імунногенній формі [174].

1. 4. 1 Характеристика *E. coli*

Кишкова паличка є постійним мешканцем товстого кишечника, який відіграє важливу роль у регуляції гомеостазу макроорганізму. Вона продукує велику кількість біологічно активних речовин: низькомолекулярні пептиди, що є засобом міжклітинної комунікації, антагоністичні низькомолекулярні білки – мікроцини, високомолекулярні – поліцини, вітаміни та інші.

Escherichia coli являють собою прямі палички з закругленими кінцями, розміром 0,4-0,6 – 6 мкм, негативно пофарбовані за Грамом, рухливі за рахунок перитрихіально розташованих джгутиків. Для деяких штамів характерна наявність мікрокапсули, побудованої з гомополімеру сіалової кислоти. *E. coli* не вибаглива до поживних факторів та добре росте на простих середовищах, утворюючи колонії S-і R-форми. Для ідентифікації *E. coli* використовують диференційно-діагностичне середовище, яке містить лактозу (Ендо, Левіна, Плоскірева). Кишкова паличка має близько 171 серогруп, які визначаються соматичним О-антигеном; капсульним К антигеном, який має три різновиди: А, В і L, які відрізняються чутливістю до температури та хімічних речовин. Відомо більш 57 сероварів, які детерміновані джгутиковим Н-антигеном. О-антиген у бактерій роду *Escherichia* мають ідентичну хімічну структуру та зв'язані з ліпополісахаридами клітинної стінки. Кишкова паличка утворює 2 токсини: екзотоксин, нейротропний, термостабільний, що руйнується при доступі повітря, загальний для різних кишкових паличок. Другий токсин – ендотоксин (ліпополісахарид), відповідає «повному антигена», термостабільний, має ентеротропну дію [139].

Будучи одним з основних видів, що населяють кишківник у нормальних умовах, кишкова паличка здатна викликати захворювання при попаданні в інші відділи кишкового тракту (тонкий кишківник) або інші системи та органи (сечові і жовчні шляхи). *E. coli* викликають 90 % інфекцій сечовивідних шляхів. Колонізація бактеріями відбувається при потраплянні їх із фекалій або з ділянки промежини й розповсюдження *E. coli* по сечовому тракту до сечового міхура.

Також кишкова паличка є причиною неонатальних менінгітів у немовлят. Штами *E. coli* потрапляють у кров немовлят із носоглотки та переносяться на мозкові оболонки. *E. coli* часто викликає запальні процеси (перитоніт, холецистит, ентерит та ін.) або явища загального сепсису [118, 137].

1. 4. 2 Характеристика *P. aeruginosa*

Синьогнійна паличка широко поширена в природі. Її виділяють з кишечника людей та різних тварин, з гною, з поверхні шкіри й слизових теплокровних, з харчових продуктів, а також із ґрунту, річкової, озерної та стічної води.

Вірулентні штами цього мікроба здатні викликати, особливо у малостійких організмів (маленькі діти, люди похилого віку, молодняк тварин), різні захворювання [34].

P. aeruginosa – це грамнегативні прямі палички, розташовані поодинокі, іноді попарно або короткими ланцюжками, що мають розмір $0,5 \times 1,5-3$ мкм. Рухливі, мають один або два джгутики, розташованих на полюсах, на поверхні клітин знаходяться фімбрії. Капсули не мають, але за певних умов продукують полісахаридний слиз. Псевдомонади – облігатні аероби; колонії плоскі, м'якої або слизової консистенції, мають характерний «солодкий» запах карамелі, який пов'язаний з продукцією триметиламіну. *P. aeruginosa* має пігмент – піоціанін, який має синьо-зелений колір. Піоціанін має властивості антибіотика, дихального ферменту й індикатора. У клітинній стінці синьогнійної палички знаходиться ліпополісахаридний антиген О-антиген, визначення якого здійснюють при серотипуванні штамів. На кров'яному м'ясопептонному агарі (МПА) навколо утворюється зони гемолізу. *P. aeruginosa* здатна окислювати вуглеводи, має О- і Н-антигени, так само фактори патогенності – фімбрії, які забезпечують адгезію бактерій на клітинах макроорганізму; гемолізін, нейрамінідазу, протеазу, елестазу, екзотоксин АДФ-рибозну трансферазу [36].

Pseudomonas aeruginosa проявляє тропізм до слизових оболонок респіраторного тракту, сечового міхура, кон'юктиви ока. Найбільшу кількість

слизу продукують мукоїдні штами, що зумовлює хронічний перебіг інфекції, особливо при остеомієліті, хронічному отиті, муковісцидозі. Екзотоксин А *P. aeruginosa* (АДФ-рибозна трансфераза) за механізмом дії відноситься до цитотоксинів, які порушують у клітинах організму синтез білка та імуноглобулінів у результаті інгібіції фактора елонгації EF-2.

P. aeruginosa потрапляє на слизові оболонки, рани, опікову поверхню та викликає локальні гнійно-запальні процеси. В результаті бактеріємії виникають вторинні гнійні осередки інфекції, сепсис, внутрішньо судинне згортання крові, респіраторний дистрес-синдром, шок. Синьогнійна паличка є збудником різних патологічних станів: діареї, ендокардиту, остеомієліту, пневмонії, менінгіту, тромбофлебиту, циститу та інших. Основними заходами неспецифічної профілактики синьогнійної інфекції є стерилізація матеріалів, дезінфекція та антисептика, дотримування правил асептики, а також ефективний контроль за обсіменінням медичних приміщень, інструментів, апаратури [114, 115].

1. 4. 3 Активація нейтрофілів під дією ліпополісахариду грамнегативних мікроорганізмів

Визначаючи хворобу як реакцію організму на його пошкодження, слід підкреслити, що вона виникає не безпосередньо на агент, а саме на пошкодження, викликане ним в організмі. У більшості випадків при бактеріальному зараженні ран першими з клітин агрегують нейтрофіли. Однак природа клітинної відповіді може сильно варіювати. У разі деяких інфекційних агентів більш важливу роль в ранній клітинній відповіді грають моноцити. У сучасній літературі велика кількість робіт присвячена дослідженню ролі моноцитарно-макрофагальній ланки в регуляції імунної відповіді на флогогенний фактор [35].

Стимулюючі ефекти моноцитів частково опосередковані монокінами. Місцеве й системне підвищення концентрацій прозапальних цитокінів (ІЛ-1 β , ФНП- α , ІЛ-6) виникає в процесі розпізнавання та подання антигенів макрофагами і необхідних для активації, проліферації й диференціювання лімфоцитів, зміни

функціонального стану нейтрофілів. Високі рівні прозапальних цитокінів викликають розвиток системної запальної реакції [169]. У розвитку інфекційного запалення беруть участь ендотеліоцити, нейтрофіли, макрофаги, еозинофіли, лімфоцити, тромбоцити, клітини гладких м'язів та фібробласти. Макрофаги виділяють ангіотензин-конвертазу, яка каталізує інактивацію брадикініну та перетворює ангіотензин-1 в ангіотензин-2. Вони активно синтезують простагландин E2, а також тромбоксани й лейкотрієни.

Оскільки простагландин E2 перешкоджає вивільненню медіаторів запалення з нейтрофілів, моноцитів, еозинофілів і лімфоцитів і, крім того, пригнічує агрегацію тромбоцитів, макрофаги володіють як прозапальною так і протизапальною функцією.

Грамнегативні бактерії екранують свій пептидоглікан від факторів імунного захисту господаря за допомогою ліпополісахариду (ЛПС), якому відводиться важливе значення в механізмах розвитку запальних процесів [10]. Грамнегативні мікроорганізми є найбільш часто циркулюючими інфекційними агентами у хворих з септичними ускладненнями, більшість з яких пов'язана з *Escherichia coli*. Друге і третє місце займають *Klebsiella* й *Enterobacter spp.* [25, 74]. Незважаючи на те, що синьогнійна паличка зустрічається менш часто, сепсис, обумовлений *Pseudomonas aeruginosa*, асоціюється з найвищим рівнем смертності. В етіології як позалікарняних, так й госпітальних інфекцій важливе значення мають окремі представники нормальної мікрофлори людини. Шкіра, дихальні шляхи, шлунково-кишковий тракт рясно заселені мікроорганізмами. Наприклад, кишковий тракт населяють мільярди бактерій *E. coli* [30].

Відповідь вродженої імунної системи є першою лінією захисту при інвазії мікроорганізмів або попаданні їх ендотоксинів у загальний кровотік. Janeway припустив існування патерн-розпізнавальних рецепторів (ПРР). Він аргументував це тим, що для вироблення антитіл проти патогена необхідний вторинний сигнал від антиген-презентуючих клітин до того ж до первинного сигналу від самого антигена [78].

Відповідь вродженої імунної системи необхідна не тільки для знищення патогена, а й для запуску специфічної адаптивної імунної відповіді за участю Т- і В-лімфоцитів розпізнавальних рецепторів для ліпополісахарида відносяться до першого класу трансмембранних білків і відомі як Toll-подібні рецептори – TLR (toll -like receptors) [28, 146].

У людини виявлено 13 членів TLR сімейства, які розпізнають широкий спектр мікробних продуктів із консервативними структурними патернами, присутніми у бактерій, грибів та вірусів. Toll-подібні рецептори відносяться до великого суперсімейства TIR-рецепторів, гомологічних по їх цитоплазматичним ділянкам – Toll / IL-1 рецепторних доменів (TIR-домени), що мають три консервативних блока, що складаються з амінокислотних залишків, ключових для передачі сигналу. При дослідженні ендотоксинів *E. coli* було показано, що TLR4, а не TLR2 є рецептором, який забезпечує активацію клітин у відповідь на ЛПС. Розпізнавання ліпополісахариду відбувається за участю чотирьох молекул: ЛПС-зв'язуючого білка - LBP, CD14, TLR4 і MD-2. CD14 і MD2 експресують багато клітин, включаючи моноцити, макрофаги, лімфоцити, ендотеліальні й епітеліальні клітини [79, 179]. TLR4 постійно експресуються на поліморфоядерних лейкоцитах, моноцитах, макрофагах, лімфоцитах і дендритних клітинах, а так само на ендотеліальних й епітеліальних клітинах [111].

MyD88 й TRIF функціонують як сигнальні адаптерні білки, які сприяють подальшій передачі сигналу від TLR4-рецептора. TIRAP і TRAM є сортувальними адаптерними білками. Сортувальні адаптерні білки безпосередньо не взаємодіють з кіназами нижчележачого сигнального шляху, але завдяки взаємодії з сигнальними адаптерними білками, сприяють їхній доставці до активованого рецептора TLR4. TIRAP й TRAM зв'язуються з цитоплазматичним доменом TLR4 через утворення зв'язку між їх TIR-доменами. Кожен з активованих рецепторів має два симетрично розташованих сайти зв'язування адаптерних білків (TIR-домени), тому обидві гіпотези активації MyD88 і TRIF актуальні [134, 186].

Висновки до розділу 1

У цьому розділі зроблено основний огляд літератури. Описані чинники первинного вродженого та вторинного адаптивного імунітету (Т- і В-лімфоцитів, фагоцитарну і ферментативну активність фагоцитуючих клітин, систему комплементу, класи імуноглобулінів, циркулюючі імунні комплекси). Наведені порушення клітинної і гуморальної ланки імунітету під впливом різноманітних чинників. Визначено формування вторинного адаптивного імунітету при старінні організму. Наведені дані щодо взаємодії мікроорганізмів із макроорганізмом, стадії запального процесу та дію ліпополісахариду грамнегативних збудників.

Результати досліджень цього розділу наведено в таких публікаціях [43, 44, 45, 50, 56, 144].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2. 1 Характеристика об'єкта дослідження

Експериментальні дослідження були виконані на 3 та 22 місячних білих безпорідних щурах-самцях. Усього в роботі було використано 192 тварини масою 100-240 гр.

Контрольною групою були тварини такого ж віку, що й експериментальній групі. Тварини містилися в умовах стандартного світлового та харчового режиму (вода і їжа *ad libitum*).

Дослідження проводили відповідно до «Спільних етичних принципів проведення експериментів на тваринах» (Україна, 2011р.), які узгоджується з положеннями Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Старбург, 1986 р) [24, 59, 64, 84].

Оцінювали фізіологічні параметри експериментальних тварин (рухова активність, температура, вага, апетит, гемодинаміка (частота серцевих скорочень, задишка), вологість шкірних покривів і вовни) за 5-ти бальною системою [93].

Дослідження фагоцитозу нейтрофілів, визначення загальної окисно-відновлювальної активності нейтрофілів у тесті відновлення нітросинім тетразолієм (НСТ-тест) проводили на клітинах гепаринізованої крові, взятої у контрольних й експериментальних тварин різного віку на тлі запального процесу та використання природних імунокоректорів [20].

Визначення імуноглобулінів класів А, М, G, концентрації C3 фрагмента комплементу та рівня циркулюючих імунних комплексів проводили на сироватці крові, отриманої від контрольних й експериментальних тварин різного віку при запальній реакції [94].

2. 2 Схеми експерименту

Під час дослідження використовували контрольні групи тварин різного віку – КГ (n=24), та експериментальні групи тварин різного віку – ЕГ (n=168).

Перший етап досліджень виконували на білих щурах-самцях 3 місячного віку – («молоді») масою 100-140 гр. і 22 місячні («старі») з масою тіла 200-240 гр. I (3 місячні самці, тваринам цієї групи внутрішньочеревно вводили 1,5 мл стерильного фізіологічного розчину) (n =4) і II (22 місячні тварини, яким внутрішньочеревинно вводили 1,5 мл стерильного фізіологічного розчину) групи щурів були контролем (n=4). III і IV групі тварин вводили внутрішньочеревинно добову агарову культуру *Pseudomonas aeruginosa* № 27835 ATCC (вводили 1,5 мл суспензії бактерій, яка містила 10^9 КУО / мл) (n=36). V і VI групі тварин вводили внутрішньочеревинно добову агарову культуру *Escherichia coli* № 25592 (F-50) ATCC (вводили 1,5 мл суспензії бактерій, яка містила 10^9 КУО / мл) (n=36). Введення бактеріальних суспензій експериментальним тваринам є моделлю, що дозволяє індукувати запальні реакції [32, 60, 80].

Контрольних та інфікованих тварин виводили з експерименту шляхом декапітації на 3-ю, 5-у і 7-у добу. На 3-ю добу запального процесу спостерігається гостра фаза інфекційного процесу, в якій відбувається гостра запальна реакція, інтенсивне розмноження бактерій та індукція імунної відповіді (апогей запального процесу). На 5-у добу запального процесу настає дихотомія – у одних особин симптоматика запального процесу знижується, а у інших особин формується системна запальна реакція. На 7-у добу настає період реконвалесценції [96, 99].

У експериментальних тварин отримували кров та сироватку крові для оцінки вродженого (активність фагоцитуючих клітин та С3 фрагмента комплементу) за допомогою світлової мікроскопії та турбодиметрії і адаптивного (імуноглобуліни класів А, М, G та циркулюючі імунні комплекси) імунітету за допомогою імуноферментного аналізу та спектрофотометрії.

На другому етапі експерименту з двох бактеріальних суспензій *P. aeruginosa* та *E. coli* була обрана суспензія *E. coli* оскільки вона володіла більш вираженою негативною дією на досліджувані показники імунітету. Контрольним та експериментальним тваринам вводили різні імунокоректори на різній стадії експериментального дослідження. I а і II а групи щурів були контрольними, після введення експериментального композитного препарату, що складається з амінокислот, нуклеотидів, ферментів, вітамінів і олігопептидів – М. (n=8). Двом віковим групам тварин із запаленням, індукованим суспензією *E. coli* вводили М. по 20 мкл/кг – 3 місячним щурам (III а група) і 40 мкл/кг – 22 місячним щурам (IV а група) (n=48). I б і II б групи щурів були контрольними після введення препарату порівняння азоксимеру броміду, що містить маніт, повідон та природний антиоксидант бета-каротин – П. (ліюфілізат, 6 мг, ТОВ «НПО Петровакс Фарм», Росія) (n=8). Двом віковим групам тварин із запаленням, індукованим суспензією *E. coli* вводили П. по 0,5 мл/кг – 3 місячним щурам (III б група) і 1 мл/кг – 22 місячним щурам (IV б група) (n=48). Дозу препаратів розраховували відповідно з терапевтичною дозою по масі тіла тварин. Ці препарати вводили експериментальним тваринам *per os*: однієї частині групи превентивно за 48-м годин до зараження експериментальних тварин, а іншій частині групи після 24-х годин введення суспензії *E. coli* (після активації запального процесу). Контрольних та інфікованих тварин виводили з експерименту шляхом декапітації на 3-ю і 7-ю добу. Отримували біоматеріал для оцінки вродженого (активність фагоцитуючих клітин та С 3 фрагмента комплекменту) імунітету та рівня зміни циркулюючих імунних комплексів.

Доцільність використання експериментальних тварин та їх кількість було погоджено по біоетиці НДІ біології університету імені В. Н. Каразіна [84].

В ході експерименту в крові визначали фагоцитарну активність нейтрофілів, визначали загальну окисно-відновлювану активність гранулоцитарних нейтрофілів у тесті відновлення нітросинім тетразолієм (НСТ-тест). У сироватці крові визначали інтенсивність утворення циркулюючих імунних комплексів,

показники концентрації імуноглобулінів класу А, М, G, а також активність утворення білка С3 фрагмента комплементу [20, 29, 61, 71, 157].

Схема експерименту



Рис 2.1 Схема експерименту

2. 3 Характеристика лабораторних методів дослідження полягала в дослідженні та оцінці зміни фізіологічних параметрів поведінки експериментальних тварин, а також використовувалися дослідження імунологічних показників вродженого та адаптивного імунітету.

2. 3. 1 Оцінка фізіологічних параметрів експериментальних тварин

Під час дослідження вимірювалися морфометричні показники в експериментальних тварин, які відображали як фізіологічні параметри: вага,

температура, рухова активність, гемодинаміка (частота серцевих скорочень, задишка) і вологість та стан шкірних покривів [93].

2. 3. 2 Визначення фагоцитарної реакції нейтрофілів крові

Під час дослідження вимірювали також імунологічні показники. Оцінка фагоцитарної активності нейтрофілів здійснювалася за кількісним визначенням поглинених та перетравлених нейтрофілами мікроорганізмів при спільній інкубації досліджуваної крові з мікробною тест-культурою. Використовували дріжджову культуру (пекарська) [94].

Для приготування дріжджової суміші розводили 1г пекарських дріжджів у 100 мл середовища 199 або фізіологічного розчину. Кип'ятили 1 годину, охолодили та додали 2 краплі формаліну. Зберігали при температурі від + 2 °С до + 10 °С. Перед вживанням 1 мл суспензії дріжджів відмили в 10 мл середовища 199 або фізіологічного розчину тричі по 10 хв. Відкрутили на центрифугі при 1000 об / хв.

Для виділення лейкоцитів у стерильну пробірку вносили 10 мл гепаринізованої крові. Кров ретельно перемішували й центрифугували 10 хв при 1000 об/хв. Плазму разом із шаром лейкоцитів відібрали та помістили в чисту центрифужну пробірку. Додали до плазми 5-6 мл середовища 199.

Лейкоцити відмили центрифугуванням протягом 10 хв при 1000 об/хв. Надосадову рідину видалили. Осад ресуспендували в середовищі 199. Центрифугували 10 хв при 1000 об/хв. Видалили надосадову рідину й частину клітинної суспензії в середовищі 199. Накапали в центрифужну пробірку 0,2 мл лейкоцитарної суспензії. Додали до лейкоцитарної суспензії 0,2 мл відмитої суспензії дріжджів. Лейкоцитарно-дріжджову суміш перемішували струшуванням. Провели інкубацію суміші при $T = 37^{\circ}\text{C}$ 30 хв. Додали в пробірку 5 мл прогрітого ізотонічного розчину хлориду натрію. Струснули й центрифугували 10 хв при 1500 об / хв. Видалили надосадову рідину. Робили

мазки з лейкоцитарної суспензії. Залишки поміщали в термостат при $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 90 хв. Повторно приготували мазки з двогодинної інкубації.

З отриманої суміші готували два мазки на знежирених предметних стеклах. Препарати висушували на повітрі. Мазки фіксували в метиловому спирті 10 хвилин. Препарати фарбували за Романовським-Гімза протягом 45-50 хв та висушували.

Облік та оцінку результатів проводили за наступною схемою:

1. Препарати переглядали під мікроскопом при збільшенні 1000 в імерсійній системі. Вважали не менше 200 клітин та виробляли розрахунок показників фагоцитозу.

2. Фагоцитарний індекс (ФІ) – відсоток клітин, що вступили в фагоцитоз, від загального їхнього числа.

3. Фагоцитарне число (ФЧ) – середня кількість бактерій, що містяться внутрішньоклітинно (частка від ділення загальної кількості поглинених бактерій на число клітин, що вступили в фагоцитоз).

4. Обидва показники (ФІ, ФЧ) розраховуються на мазках, зроблених після 30-и хвилинної, а ФЧ і 90-о хвилинної (тобто в цілому 120-и хвилинної) інкубації (ФІ 30, ФІ 120 і ФЧ 30, ФЧ 120).

5. Коефіцієнт фагоцитарного числа – КФЧ (індекс завершеності фагоцитозу): $\text{КФЧ} = \text{ФЧ } 30 / \text{ФЧ } 120$ [61].

Індекс завершеності відображає перетравлюючу здатність нейтрофілів.

2. 3. 3 Визначення загальної окисно-відновної активності нейтрофілів в тесті відновлення нітросинім тетразолієм (НСТ-тест)

Визначення кисневозалежного фагоцитозу здійснювали по відновленню поглиненого фагоцитом розчинного барвника нітросинього тетразолія в нерозчинний діформазан, під впливом супероксид-аніону, який утворюється в НАДФ-Н-оксидазній реакції. Відкладення синьо-фіолетових гранул діформазана в фагоцитуючих клітинах, як вважають, відповідає локалізації НАДФ-Н-оксидази.

При цьому розміри діформазанових відкладень є показником сумарної активності НАДФН-оксидази, яка ініціює процес стимуляції фагоциту в НСТ-тесті, що інтегрально характеризує киснево-антиінфекційні системи фагоциту.

Для приготування робочих розчинів використовували ізотонічний фосфатний буферний розчин:

- 1) 3,6 г KH_2PO_4 або 15,6 г $\text{NaH}_2\text{P}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ розчиняли в 0,85 %-му розчині NaCl . Об'єм розчину доводили до 1 л (розчин № 1);
- 2) 17,8 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ або 35,8 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ розчин в 0,85 %-ном розчині NaCl . Об'єм розчину доводили до 1 л (розчин № 2);
- 3) Змішували 13 частин розчину №1 і 37 частин розчину №2, $\text{pH} = 7,2$ [20].

Для постановки НСТ-тесту необхідно використовувати сіль паранітротетразолію синього з молекулярною масою 817,7.

Для цитохімічної модифікації НСТ-тесту застосовували 0,15 %-ний розчин солі тетразолію, виготовлений на фізіологічному буферном розчині (пропис наведена вище). Посуд, в якій готується розчин, повинен бути стерильно чистим. Слід мати на увазі, що солі тетразолію розчиняються досить повільно, тому для прискорення процесу приготування розчину доцільно скористатися магнітною мішалкою.

Приготований розчин повинен бути абсолютно прозорим, на дні не повинно бути ніяких осадів. Розчин не втрачає своєї активності протягом 10-и днів за умови зберігання його при температурі 4°C в темряві.

Далі готували суспензію зімозана. Зімозан є стимулятором фагоцитарної активності нейтрофілів. Для його приготування 1 мл стандартної суспензії зімозана змішували з рівною кількістю свіжої нормальної сироватки, отриманої від 4-5 донорів, інкубували протягом години при $T=37^\circ\text{C}$ та одноразово відмивали фізіологічним фосфатним буферним розчином, після чого зімозан розводили новою порцією розчину до концентрації 3 мг / мл.

У дві аглютінаційні пробірки (пробірки й мікропіпетки попередньо промивали розчином гепарину 100 ед / мл) вносили по 0,05 мл капілярної крові,

потім в одну з них додавали 0,025 мл ізотонічного фосфатного буфера, в іншу – 0,025 мл суспензії зімозана. Вносили в пробірки по 0,025 мл 0,15%-ного розчину НСТ. Вміст пробірки обережно змішували та інкубували на водяній бані при температурі 37 °С протягом 30 хв, перемішуючи кожні 10 хв.

Після закінчення інкубації вміст перемішували, наносили по одній краплі на ретельно вимиті й обезжиренні сумішню Нікіфорова предметні стекла, робили мазки й висувували на повітрі.

Готові мазки фіксували метанолом 10 хв, висувували, дофарбовували 2 %-ним водним розчином метилового зеленого протягом 20 хв, промивали, висувували та дивились у мікроскоп. Облік реакції проводили наступним чином.

Препарати досліджували під мікроскопом. У кожному мазку рахували 100 нейтрофілів й обчислювали відсоток клітин, що містять включення діформазана у вигляді гранул або суцільних відкладень, а також середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК) за формулою Астальдо-Вергша. Для цього клітини ділили на 4 групи за кількістю гранул діформазана:

(А) – з нульовою активністю (гранул немає) - 0

(В) – зі слабкою позитивною реакцією (поодинокі гранули) 1+

(С) – з позитивною реакцією (гранули покривають до 50% площі цитоплазми)
2 ++

(D) – з різко позитивною реакцією (більше 50 % площі цитоплазми зайнято гранулами) 3 +++

Для підрахунку користувались лабораторним лічильником клітин.

У сумі $a + b + c + d = 100$, тоді відсоток позитивних клітин –

$$b + c + d = 100 - a \%,$$

$$a \text{ СЦК} = (1 \times b + 2 \times c + 3 \times d) / 100$$

Вираховували також індекс стимуляції (ІС)

$$ІС = (\% \text{ поз. кл. в ст. НСТ-тесті}) / (\% \text{ поз. кл. в сп. НСТ-тесті}) [20].$$

2. 3. 4 Визначення рівня циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) в сироватці крові щурів

Антигени й антитіла, що входять до складу ЦІК, суттєво відрізняються за валентністю, за розміром, зарядом, стерічному розподілу детермінант та ін. Різноманітність властивостей антигенів та антитіл та їхнє співвідношення призводить до формування імунних комплексів, які істотно розрізняються за фізико-хімічними й біологічними властивостями.

Патологічні реакції на імунні комплекси визначаються підвищенням швидкості їх утворення над швидкістю елімінації, дефіцитом одного або декількох компонентів комплементу або функціональними дефектами фагоцитарної системи. Імунні комплекси відіграють важливу роль у контролі запальних процесів й алергічних реакцій 3-го типу, при яких рівень ЦІК підвищується, а також в оцінці ефективності проведеного лікування. Підвищення рівня ЦІК характерно для гострих бактеріальних і вірусних інфекцій, аутоімунних захворювань, ревматизму та ін. Вміст ЦІК у сироватці крові визначали методом преципітації. Як преципітуючий реагент використовували поліетиленгліколь (ПЕГ) 6000. У пробірку з контролем до 2,9 мл боратного буфера додавали 0,1 мл сироватки крові. У пробірку з міткою «дослід» до 0,2 мл боратного буфера додавали 2,7 мл ПЕГ та 0,1 мл сироватки крові. Після цього проби ретельно перемішували й інкубували одну годину при кімнатній температурі. Вимірювання оптичної щільності проводили на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі $\lambda = 450$ нм проти боратного буфера.

$$L = D_1 - D_0, \quad (2.1)$$

де

D_1 – оптична щільність контрольної проби;

D_0 – оптична щільність дослідної проби.

Значення концентрації ЦІК обчислювали як різницю між значеннями контролю й досліді [29].

2. 3. 5 Визначення C3 фрагмента комплементу

Комплемент C3 – центральний об'єкт у класичній та альтернативній методиці з визначення комплементу. C3 – складова конвертази C5. При активації продукти розщеплення C3 мають важливі біологічні функції. C3b – опсонін, задіяний в імунній адгезії. C3a – анафілотоксин і хіміотоксин. C3 веде себе подібно білку гострої фази, тому його збільшені рівні можуть бути виявлені при гострих запальних реакціях.

Аналіз C3 ґрунтується на турбодиметричному вимірі. Каламутність викликана утворенням нерозчинного імунокомплексу антиген-антитіло. Утворення комплексів стимулюється і посилюється PEG. Метод визначення концентрації C3 фрагмента комплементу заснований на взаємодії білка зі специфічними антитілами з утворенням імунокомплексів, преципітація яких призводить до збільшення каламутності розчину при довжині хвилі $\lambda = 340$ нм пропорційно концентрації фрагмента комплементу C3 у зразку.

Концентрацію C3 фрагмента комплементу визначали за допомогою імунотурбодиметричного методу при довжині хвилі 340 нм на біохімічному аналізаторі Stat Fax 1904 Plus. *Реагент антитіл C3* 1×10 мл: турбодиметричне гранулометричне антитіло, яке вирощували у козлі, моноспецифічне для C3 фрагмента комплементу, азид натрія 0,095 %. *Буфер PEG4* 5×25 мл: фосфатний буферизований соляний розчин, PEG 4 %, азид натрія 0,095 %. Виробник – Діалаб (Австрія). Діагностичні реагенти для кількісного *in vitro* визначення комплементу C3 у сироватці крові турбодиметричним методом аналізу: для створення калібрувальної кривої використовували протеїновий калібратор високий шляхом проведення розведень 1:2 з 0,9 % соляним розчином як розріджувач. Як варіант, використовували набір протеїнових калібраторів. Використовували 0,9 % соляний розчин як нульову точку. Процедура аналізу з розбавленням зразка: калібратори буфер 900 мкл, кал. 5 мкл, паралельно ставили таку ж пробу зразка/контролю, перемішували, підраховували при хвилі 340 нм, потім додавали реагент антитіл 80 мкл, перемішували й інкубували 5 хвилин при температурі аналізу.

Обчислювали $\Delta A = (A_2 - A_1)$ калібраторів проти концентрацій значень на лінійно – лінійно картатому папері. Обчислювали ΔA оптичні щільності зразків і контролів і враховували значення в мг/дл на референтній кривій.

Зразки, які виходили за значення абсорбції найвищого калібратора, аналізували повторно після чергового розведення [157].

2. 3. 6 Визначення концентрації вмісту сироваткових імуноглобулінів класів А, М, G

Імуноглобуліни є характерним продуктом секреції В-клітин на кінцевій стадії їхнього диференціювання, тобто плазматичних клітин. Концентрація імуноглобулінів у сироватці крові є результатом установа, між їх синтезом та розпадом. При взаємодії антигена та специфічного імуноглобуліну (антитіла) утворюється високомолекулярний комплекс. Антиген, внесений у лунку, що містить специфічні антитіла, який дифундує, утворює преципітат. Величина преципітату відображає кількість антитіл, еквівалентних концентрації антигена, внесеного в лунку – імуноферментний аналіз.

Для визначення концентрації імуноглобулінів (Ig) А, М, G використовували стандартний набір моносспецифічних сироваток проти імуноглобулінів щурів та стандартних сироваток із відомою концентрацією IgA, IgM, IgG (Rat Immunoglobulin Isotyping ELISA Kit (RUO)). Виробник – BD Pharmingen.

Визначення концентрації імуноглобулінів проводили в 96-и ямкових імунологічних планшетах. У лунки планшета, крім осередку А (холоста проба), вносили по 0,01 мл досліджуваної проби. Потім до досліджуваної сироватки додавали по 0,01 мл антисироватки до IgA, IgM, IgG (ряд 1, ряд 2, ряд 3), після чого в усі лунки вносили по 200 мкл 7 %-ного розчину ПЕГ (м. в. 6000). Проводили інкубацію планшета при кімнатній температурі одну годину. Після закінчення інкубації вимірювали оптичну щільність зразків на приладі Stat Fax 320 при довжині хвилі $\lambda = 405$ нм. За попередньо побудованими калібрувальними

кривими визначали концентрації імуноглобулінів, використовуючи отримані дані [71].

2. 4 Статистична обробка результатів дослідження

Для статистичної обробки результатів досліджень використовували параметричні й непараметричні методи варіаційної статистики.

Статистичний аналіз результатів досліджень, які нормально розподіляються, проводили з використанням параметричного критерію Стюдента ($p \leq 0,05$). У разі малих вибірок і за умови відсутності нормального розподілу отриманих даних використовували критерій Манна-Уїтні. Обчислювали середнє арифметичне значення (M), помилку середнього арифметичного значення (m) і представляли у вигляді ($M + m$). Для обробки даних й графічної візуалізації результатів використовували програми «Statistica» та «Microsoft Excel». Для кількісної оцінки взаємозв'язку даних, отриманих різними методами, і які нормально розподіляються, розраховували коефіцієнт кореляції Пірсона між значеннями показників за формулою. Зв'язок між даними, розподіл яких не відповідає нормальному закону, оцінювали за допомогою коефіцієнта кореляції Спірмена [73, 90].

Висновки до розділу 2

В даному розділі було використано наступні методи лабораторної діагностики: визначення фізіологічних параметрів поведінки контрольних та експериментальних тварин різного віку. Завершеність фагоцитозу з тест-культурою – морфологічний метод у мазках крові – для визначення фагоцитарної активності нейтрофілів периферичної крові: кисневий метаболізм нейтрофілів досліджували за їхньою здатністю поглинати нітросиній тетразолій і відновлювати його до діформаза у вигляді гранул синього кольору під дією супероксиданіона, який утворюється в НАДФ – оксидазній реакції, який ініціює

процес стимуляції фагоцитозу (НСТ-тест) – світлова мікроскопія. Спектрофотометричний метод – для визначення вмісту циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові щурів. Турбодиметричний метод – для визначення активності системи комплементу по співвідношенню оптичної щільності зразка і контрольної проби. Імуноферментний аналіз – для визначення вмісту імуноглобулінів класів А, М, G. Проводили статистичні методи оцінки отриманих результатів.

Ці методичні рекомендації були використані в наступних публікаціях [40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 144].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

3. 1 Оцінка фізіологічних параметрів експериментальних тварин

Протягом усього експерименту проводили спостереження морфометричної зміни поведінки експериментальних тварин різного віку. Оцінювали такі фізіологічні параметри (рухова активність, температура, вага, апетит, гемодинаміка (частота серцевих скорочень, задишка), вологість та стан шкірних покривів) за 5-ти бальною системою (табл. 3.1) [93].

Таблиця 3.1

Динаміка зміни фізіологічних параметрів 3 і 22 місячних тварин після запалення, індукованого введенням різноманітних інфекційних антигенів (*P. aeruginosa*, *E. coli*) на різних етапах експерименту

Фізіологічний параметр (n=6)	Показник КГ		Показники ЕГ					
			3-я доба		5-а доба		7-а доба	
	3	22	3	22	3	22	3	22
Рухова активність	5,0± 0,1	5,0± 0,1	4,0± 0,2	2,0± 0,1	4,0± 0,2	2,0± 0,1	4,0± 0,2	3,0± 0,1
Температура, °C	36,8± 0,1	36,8± 0,1	37,1± 0,2	36,9± 0,1	37,2± 0,2	36,8± 0,1	37,2± 0,2	36,8± 0,1
Вага, г.	130± 1	230± 1	100± 2	225± 1	100± 2	225± 1	105± 2	225± 1
Апетит	5,0± 0,1	5,0± 0,1	2,0± 0,1	4,0± 0,2	2,0± 0,1	3,0± 0,2	2,0± 0,1	4,0± 0,2
Гемодинаміка	1,0± 0,1	1,0± 0,1	2,0± 0,1	4,0± 0,2	1,0± 0,1	3,0± 0,2	1,0± 0,1	4,0± 0,2
Збільшення вологості покривів	1,0± 0,1	1,0± 0,1	1,0± 0,1	3,0± 0,2	2,0± 0,1	3,0± 0,2	1,0± 0,1	3,0± 0,2

Рухова активність, вага та апетит	— 5 балів норма показників 1 бал погіршення показників
Гемодинаміка, вологість покривів	— 1 бал норма показників 5 балів погіршення показників

У таблиці 3.1 показано, що у 3 місячних експериментальних тварин були знижені параметри ваги й апетиту, а також була збільшена температура тіла експериментальних тварин порівняно з контрольними тваринами, а у 22 місячних експериментальних тварин знижувалася рухова активність, також спостерігали появу прискореного серцебиття, задишки й вологості шкірних покривів.

3. 2 Показники кисневонезалежного і кисневозалежного фагоцитозу нейтрофілів контрольних та тварин різного віку з експериментальною інфекцією

Показники кисневонезалежного фагоцитозу. Фактори вродженого імунітету забезпечують бар'єрну функцію організму на ранніх етапах онтогенезу та виконують роль індуктора реакцій вторинного адаптивного імунітету. Функціональний стан вродженого імунітету залежить від видових, генетичних особливостей і взаємодії макроорганізму з інфекційними антигенами [26]. В онтогенезі відбувається зміна експресії рецепторів, що забезпечують адгезію антигенів та активність внутрішньоклітинних ферментів, які беруть участь у процесингу (перетравленні) антигенів.

Науковці сучасної літератури, вивчаючи процес внутрішньоклітинного травлення в різних таксономічних групах тварин і людей, дійшли висновку, що це є загальнобіологічний чинник, який забезпечує захист від інфекційних антигенів. Неспецифічна резистентність організмів сформувалася в процесі тривалої еволюції і є властивістю всієї популяції виду однотипно реагувати на вторгнення патогенних мікроорганізмів [38].

Однак формування імунної відповіді у присутності інфекційних агентів на різних етапах онтогенезу вивчені недостатньо. В науковій літературі є відомості про те, що при старінні (в пізньому онтогенезі) виникають порушення багатьох метаболічних процесів [16].

На початковому етапі експерименту з моделювання запального процесу проводили дослідження фагоцитарного індексу (ФІ – кількості клітин, що вступили у фагоцитоз, від загального їх числа), фагоцитарного числа (ФЧ – середнє число бактерій, розташованих внутрішньоклітинно), а так само індексу завершеності фагоцитозу (ІЗФ). В цій роботі не виявили відмінностей цих показників у молодих та старих тварин контрольної групи (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Показники кисневонезалежного фагоцитозу контрольних тварин різного віку

№ групи	Контрольні тварини (n=4)	Показник фагоцитозу (M±m)		
		Фагоцитарний індекс (ФІ, %)	Фагоцитарне число (ФЧ, ум.од.)	Індекс завершеності фагоцитозу (ІЗФ, ум.од.)
КГ I	3 міс	81,00±0,50	3,73±0,03	1,45±0,06
КГ II	22 міс	82,00±0,50	3,61±0,03	1,14±0,02

Результати дослідження показали, що середні показники, що характеризують фагоцитоз нейтрофілів (ФІ, ФЧ та ІЗФ) у контрольних тварин різного віку статистично не відрізняються один від одного ($P > 0,05$). Фагоцитарний індекс був досить високий в обох вікових групах тварин і становив $(81,00 \pm 0,50) \%$ у 3 місячних тварин та $(82,00 \pm 0,50) \%$ у 22 місячних тварин. Середня величина показника ФЧ була на одному рівні й так само не відрізнялася у тварин різного віку (у 3 місячних $(3,73 \pm 0,03)$ ум. од. та у 22 місячних експериментальних тварин $(3,61 \pm 0,03)$ ум. од. Індекс завершеності фагоцитозу

вказував на перетравлюючу здатність мікроорганізмів, який відповідав нормі у молодих і у старих тварин.

Оцінку хемотаксису, адгезії й ендоцитозу нейтрофілів проводили на різних стадіях формування запального процесу. Всі стадії фагоцитозу нейтрофілів досліджували в динаміці на 3-ю, 5-у і 7-у добу. На експериментальних моделях індукованого запального процесу тварин різного віку показники фагоцитозу відрізнялися від значень контрольних тварин. У групах тварин, яким індукували запальний процес за допомогою інфекційних антигенів *P. aeruginosa* та *E. coli* (III, IV, V та VI групи тварин), виявляли різну ступінь відхилення показників фагоцитозу від норми (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Показники кисневонезалежного фагоцитозу тварин різного віку з запаленням обумовленим введенням *P. aeruginosa*

№ групи	Вік тварин (n=6)	Показник фагоцитозу (M±m)		
		Фагоцитарний індекс (ФІ, %)	Фагоцитарне число (ФЧ, ум.од.)	Індекс завершеності фагоцитозу (ІЗФ, ум.од.)
3-я доба				
ЕГ III	3 міс	48,00±2,40*	2,48±0,02	0,91±0,04
ЕГ IV	22 міс	71,00±4,10*	2,01±0,01	1,01±0,02
5-а доба				
ЕГ III	3 міс	62,00±3,70*	2,39±0,02	0,80±0,03*
ЕГ IV	22 міс	52,00±3,40*	2,59±0,02	0,89±0,02
7-а доба				
ЕГ III	3 міс	51,00±3,40*	2,60±0,02	1,28±0,05
ЕГ IV	22 міс	39,00±2,10*	1,82±0,01*	0,83±0,02*

Примітка: * - тут та далі достовірність відмінності з контролем $P \leq 0,05$

У тварин, яким вводили синьогнійну і кишкову палички виявили односпрямовані зміни досліджуваних показників фагоцитозу (ФІ, ФЧ та ІЗФ), але різну ступінь вираженості цих показників.

Після введення *P. aeruginosa* внутрішньочеревинно, виявили достовірні зміни адгезії та ендоцитозу нейтрофілів у двох досліджуваних групах експериментальних тварин протягом усього експерименту (3-7 доба) [50].

На ранніх етапах дослідження (3-я доба після введення інфекційного антигена) виявили пригнічення адгезивної функції фагоцитарних нейтрофілів, про що судили за фагоцитарним індексом у всіх досліджуваних тварин. У 3 місячних щурів показник ФІ знижувався майже в 2 рази порівняно з контролем та становив $(48,00 \pm 2,40) \%$ ($P < 0,05$).

Величина ФЧ була знижена у тварин обох вікових груп. У молодих тварин кількість поглинутих мікроорганізмів була трохи нижче, ніж у старих $(2,48 \pm 0,02)$ ум. од. у молодих та $(2,01 \pm 0,01)$ ум. од. у старшій групі, індекс завершеності фагоцитозу був не відрізнявся в обох вікових групах тварин інфікованих синьогнійною паличкою порівняно з контролем.

У 22 місячних тварин на 5-у добу ФІ знизився до $(52,00 \pm 3,40) \%$ від показника контрольної групи, а у молодих тварин перетравлююча функція фагоцитів дещо зросла, але була значно нижче контрольних значень. Спостерігали зниження ІЗФ у молодих та старих тварин інфікованих *P. aeruginosa* на 5-у добу, причому зниження індексу завершеності фагоцитозу було більш виражено у молодих тварин. Таким чином, молоді тварини виявили більшу чутливість до *P. aeruginosa* [40, 47].

На завершальних етапах експерименту виявлено найбільш виражені відмінності між активністю фагоцитуючих клітин у молодих та старих тварин. В ці терміни дослідження (7-а доба експерименту) активність фагоцитозу знижувалася до $(39,00 \pm 2,10) \%$ у старих тварин, у молодих тварин ФІ у ці терміни був так само нижче контролю на тлі запального процесу, викликаного синьогнійною паличкою. У молодих тварин виявили деяку стабілізацію ФЧ, а у

старих тварин було знижене фагоцитарне число та спостерігалось пригнічення перетравлюючої функції фагоцитів, яка становила – $(0,83 \pm 0,02)$ ум. од. при контрольних значеннях $(1,14 \pm 0,02)$ ум. од.

Таким чином, на моделі індукованого запального процесу після введення *P. aeruginosa* старим і молодим тваринам виявлено пригнічення активності фагоцитозу. Більш виражене пригнічення спостерігали у молодих тварин у середині експерименту (5-а доба), а у старих на завершальному етапі експерименту (7-а доба) після їх інфікування антигеном *P. aeruginosa*.

У другій групі експериментальних тварин були вивчені закономірності зміни фагоцитарної активності на тлі індукційного запального процесу, зумовленого антигеном *E. coli* (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

**Показники кисневонезалежного фагоцитозу тварин різного віку з
запаленням, індукованим введенням *E. coli***

№ групи	Вік тварин (n=6)	Показник фагоцитозу (M±m)		
		Фагоцитарний індекс (ФІ, %)	Фагоцитарне число (ФЧ, ум.од.)	Індекс завершеності фагоцитозу (ІЗФ, ум.од.)
3-я доба				
ЕГ V	3 міс	32,00±2,40*	2,51±0,02	1,31±0,05
ЕГ VI	22 міс	51,00±3,40*	2,55±0,02	1,18±0,01
5-а доба				
ЕГ V	3 міс	68,00±3,70*	2,19±0,02	1,20±0,04
ЕГ VI	22 міс	45,00±2,70*	2,22±0,02	1,16±0,01
7-а доба				
ЕГ V	3 міс	57,00±5,90*	2,33±0,02	0,97±0,01*
ЕГ VI	22 міс	66,00±3,40*	2,62±0,02	1,01±0,02

У тварин V (3 місячні) та VI групи (22 місячні) після введення *E. coli* спостерігали більш виражене пригнічення фагоцитарної активності на ранніх етапах експерименту порівняно з аналогічними змінами з бактеріальним антигеном *P. aeruginosa*. Такий показник як ФЧ на всіх етапах дослідження змінювався аналогічно такому після введення синьогнійної палички.

Показник індексу завершеності фагоцитозу у старих тварин був трохи збільшений на ранніх етапах експерименту та становив $(1,18 \pm 0,01)$ ум. од. при $(1,14 \pm 0,02)$ ум. од. в контролі. У молодих тварин на 7-у добу експерименту знизився показник ІЗФ, порівняно зі старшою групою тварин $(1,01 \pm 0,02)$ ум. од. та становив $(0,97 \pm 0,01)$ ум. од.

Таким чином, формування імунної відповіді залежить не тільки від віку експериментальних тварин, а так само від природи інфекційного антигену та стадії запального процесу [42, 43].

Показники кисневозалежного фагоцитозу нейтрофілів тварин різного віку з експериментальною інфекцією. Фізіологічна функція, яка як і всі процеси живих організмів, є мінливою. Так, наприклад, під впливом антигенів і токсинів фагоцитуючі клітини можуть частково або повністю втрачати фагоцитуючу здатність. Ефективність функціонування імунної системи знижується із збільшенням віку, в результаті чого зростає захворюваність та смертність від інфекційних хвороб. При старінні ефективність роботи імунної системи знижується, але різні ланки імунореактивності змінюються різною мірою. На цьому тлі формуються певні патерни імунних реакцій вродженого та адаптивного імунітету. З даних світової та вітчизняної наукової літератури відомо, що при старінні порушується функція ферментів, що забезпечують різні біологічні процеси в результаті епігеномних змін цих біологічних каталізаторів, багато ферментів зазнають конформаційні зміни, а отже й функціональну здатність [95].

У інтактних контрольних тварин різного віку виявили достовірні відмінності в показниках кисневозалежного фагоцитозу у НСТ-тесті. У молодих контрольних тварин ферментативна окиснювальна активність більш активна в стимульованому тесті, на низький метаболічний резерв фагоцитуючих клітин у

старшій віковій контрольній групі вказує низький показник стимульованого тесту ($54,00 \pm 2,50$) % проти ($77,00 \pm 2,90$) % у молодих. У спонтанному тесті достовірних відмінностей між двома віковими групами експериментальних тварин не виявлено (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Показники кисневозалежного фагоцитозу контрольних тварин різного віку

№ групи	Вік контрольних тварин (n=4)	Спонтанна та індукована активність ферменту НАДФ-Н у фагоцитах ($M \pm m$)				
		% СП	% СТ	% СЦК СП	% СЦК СТ	% ІС
КГ I	3 міс	$29,00 \pm 0,40$	$77,00 \pm 2,90^*$	$0,32 \pm 0,02$	$0,41 \pm 0,02$	$2,70 \pm 0,09^*$
КГ II	22 міс	$30,00 \pm 0,50$	$54,00 \pm 2,50$	$0,21 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,01$	$1,80 \pm 0,06$

Примітка: * - достовірність відмінності КГ I проти КГ II $P \leq 0,05$

Під час експерименту виявили, що інтенсивність ферментативної активності у молодих тварин у 1,4 рази перевищувала показники індексу стимуляції у старих тварин, яка і становила ($2,70 \pm 0,09$) % у молодих та ($1,80 \pm 0,06$) % у старих експериментальних тварин.

Після введення антигена *P. aeruginosa* на 3-ю добу експерименту у молодих тварин збільшився показник спонтанного тесту в 2,5 рази та становив ($71,00 \pm 3,50$) %, а стимульованого тесту в 1,2 рази ($82,00 \pm 2,10$) %. Але на 5-у добу експерименту показники спонтанного та стимульованого тесту молодих тварин знижуються порівняно з контролем. На 7-у добу експерименту у 3 місячних тварин виявили достовірне зниження показників стимульованого тесту, який становив ($46,00 \pm 3,60$) % при ($77,00 \pm 2,90$) % у контролі.

У молодих експериментальних тварин показник індексу стимуляції (ІС) знижувався на всіх етапах експерименту, що свідчить про незадовільний стан бактерицидної системи клітин (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Показники кисневозалежного фагоцитозу тварин різного віку з моделлю запалення, індукованого введенням *P. aeruginosa*

№ групи	Вік тварин (n=6)	Спонтанна та індукована активність ферменту НАДФ-Н у фагоцитах (M±m)				
		% СП	% СТ	%СЦКСП	%СЦК СТ	% ІС
3-я доба						
ЕГ III	3 міс	71,00±3,50*	82,00±2,10	0,64±0,04	1,34±0,06*	1,15±0,04*
ЕГ IV	22 міс	33,00±2,10	70,00±5,80*	0,53±0,02	1,51±0,04*	2,13±0,09
5-а доба						
ЕГ III	3 міс	28,00±2,60	71,00±3,10	0,33±0,02	1,22±0,05*	2,53±0,08
ЕГ IV	22 міс	30,00±2,50	58,00±1,40	0,41±0,02	0,82±0,02	1,93±0,07
7-а доба						
ЕГ III	3 міс	28,00±2,10	46,00±3,60*	0,41±0,03	0,61±0,03	1,64±0,06*
ЕГ IV	22 міс	34,00±2,60	58,00±1,40	0,45±0,02	0,72±0,02	1,99±0,07

У старих тварин після введення антигена *P. aeruginosa* індекс стимуляції (ІС) в НСТ-тесті протягом усього експерименту мав тенденцію до збільшення, особливо на ранньому етапі експерименту (3-а доба) та становив ($2,13 \pm 0,09$) % при ($1,80 \pm 0,06$) % в контролі, що свідчить про наявність фізіологічного резерву імунокомпетентних клітин.

У всіх обстежуваних групах (III, IV, V і VI) після введення антигенів *P. aeruginosa* і *E. coli* у молодих та старих тварин в усі терміни експерименту були збільшені показники СЦК СП і СЦК СТ, що відображають інтенсивність енергетичних процесів фагоцитуючих клітин порівняно з цими показниками молодих та старих контрольних груп.

У таблиці 3.7 показано дослідження кисневозалежного фагоцитозу після введення експериментальним тваринам антигена *E. coli*. Індекс стимуляції у молодих тварин з моделлю запалення, індукованого введенням *E. coli*, на всіх

етапах експерименту знизився порівняно з контролем, що свідчить про низький метаболічний резерв фагоцитів у молодих тварин.

Таблиця 3.7

Показники кисневозалежного фагоцитозу тварин різного віку з моделлю запалення, індукованого введенням *E. coli*

№ групи	Вік тварин (n=6)	Спонтанна та індукована активність ферменту НАДФ-Н у фагоцитах (M±m)				
		% СП	% СТ	СЦК СП	СЦК СТ	% ІС
3-я доба						
ЕГ V	3 міс	27,00±1,10	55,00±3,60*	0,73±0,05*	0,81±0,02*	2,03±0,07
ЕГ VI	22 міс	37,00±1,10	77,00±6,60*	0,53±0,03*	1,44±0,07*	2,04±0,09
5-а доба						
ЕГ V	3 міс	31,00±1,60	69,00±3,90*	0,42±0,03	1,01±0,05*	2,22±0,08
ЕГ VI	22 міс	42,00±4,10*	54,00±0,01	0,47±0,04	1,24±0,06*	1,29±0,04*
7-а доба						
ЕГ V	3 міс	32,00±2,40	61,00±3,60*	0,55±0,03	0,92±0,04*	1,90±0,06
ЕГ VI	22 міс	27,00±1,60	53,00±0,01	0,36±0,02	0,57±0,03	1,55±0,05

У старих же тварин з моделлю системного запалення суспензією *E. coli* лише на 3-ю добу після введення мікроорганізму спостерігалось збільшення показника ІС ($2,04 \pm 0,09$) % при ($1,80 \pm 0,06$) % в контролі.

На 5-у добу експерименту у 22-х місячних експериментальних тварин спостерігали тенденцію до зниження індексу стимуляції, який становив ($1,29 \pm 0,04$) % при ($1,80 \pm 0,06$) % в контролі, що свідчить про вікові відмінності показників, що залежать від природи антигена та стадії запальної системної реакції [50].

Таким чином, у старих тварин з моделлю запалення, індукованого одноразовим введенням бактеріальних антигенів різних видів – *P. aeruginosa* та

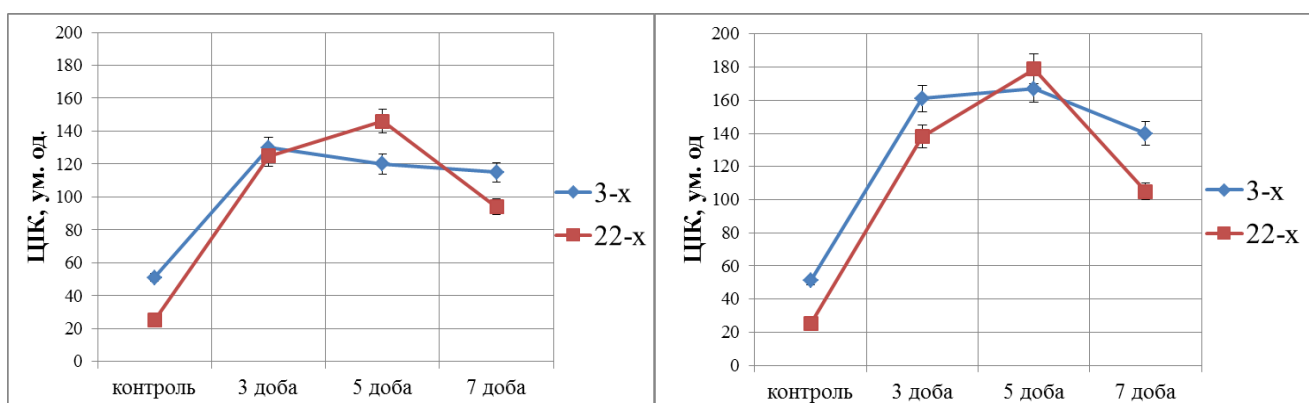
E. coli виявлено підвищення ферментативної активності нейтрофілів на перших етапах експерименту [53].

3.3 Дослідження гуморальної ланки імунітету після дії *P. aeruginosa* та *E. coli* контрольних та експериментальних тварин різного віку

Визначення концентрації циркулюючих імунних комплексів. За фізіологічних умов, утворення та присутність циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) у рідинах є одним із проявів імунної відповіді організму на надходження антигенів, а також важливим чинником, який забезпечує імунітет [145].

ЦІК виступають в ролі агентів, що беруть участь у регуляції імунної відповіді та підтримці зв'язку між імунною системою й іншими регуляторними системами організму та спрямовані на його захист. У присутності інфекційних антигенів та під дією імунотропних препаратів інтенсивність утворення ЦІК може змінюватися.

Концентрація циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) у контрольній групі у молодих тварин відповідала нормі, а у тварин старшого віку (22 міс.) була в 2 рази нижче та становила $(25,0 \pm 6,0)$ ум. од. (рис. 3.2).



P. aeruginosa

E. coli

Рис. 3.2 Концентрація циркулюючих імунних комплексів тварин різного віку в контролі та з моделлю запалення, індукованого введенням *P. aeruginosa* та *E. coli*

Після введення різних інфекційних антигенів *P. aeruginosa* та *E. coli* на 3-ю добу експерименту інтенсивність утворення ЦІК була вищою в обох вікових групах.

На 5-у добу інтенсивність утворення ЦІК була високою в обох групах порівняно з контролем, а у старих тварин достовірно вище, ніж у молодих.

На 7-у добу у період реконвалесценції у молодих та старих тварин концентрація циркулюючих імунних комплексів знижувалася порівняно з 3-ю добою дослідження, однак все одно цей показник був достовірно вище контрольних значень. У молодих тварин зв'язування антигена імуноглобулінами відбувалося більш інтенсивно, ніж у старих тварин, що свідчить про більш високу імунну реактивність [47].

Таким чином, концентрація ЦІК була достовірно збільшена протягом усього експерименту у тварин двох вікових груп, що свідчить про активацію зв'язування імуноглобулінами бактерій [43, 46, 52].

Вміст і споживання С3 фрагмента комплементу. Певний інтерес представляє вивчення особливостей реакцій вродженого й адаптивного гуморального імунітету на інфекційні антигени. Важливою сполучною ланкою між формуванням вроджених імунних реакцій та адаптивного імунітету є білки системи комплементу, а так само реакції адаптивного гуморального імунітету, які формуються за рахунок утворення специфічних антитіл. До вродженого гуморального фактору імунітету відноситься С3 фрагмент комплементу, який має виражену опсонізуючу дію [136].

Поріг реактивності молодих та старих експериментальних тварин може визначати відповідні зміни вроджених і адаптивних гуморальних факторів імунорезистентності у відповідь на інфекційні антигени.

Під час дослідження ми виявили відмінності сироваткових показників гуморальної ланки вродженого імунітету між молодими та старими експериментальними тваринами. У молодих контрольних тварин концентрація С3 фрагмента комплементу була на 20 % вище, ніж у старшій групі та становила $(0,65 \pm 0,01)$ г/л, проти $(0,45 \pm 0,02)$ г/л у старих (рис. 3.3).

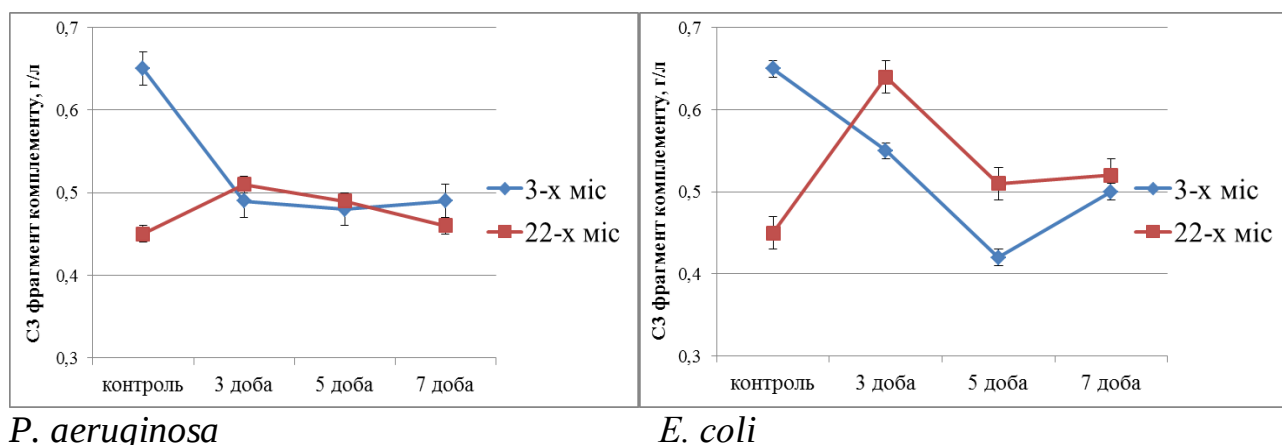


Рис. 3.3 Вміст С3 фрагмента комплементу тварин різного віку в контролі та з моделлю запалення, індукованого введенням *P. aeruginosa* та *E. coli*

Рисунок 3.3 показує вміст опсонізуючого фактора С3 фрагмента комплементу після внутрішньочеревинного введення суспензії *P. aeruginosa* об'ємом 1,5 мл, що містить 10^9 КУО / мл. В ході дослідження виявили достовірні зміни в групах експериментальних тварин. У молодих експериментальних тварин концентрація С3 фрагмента комплементу була знижена протягом усього експерименту, у старих же тварин навпаки цей показник був вище контрольних значень і на 3-ю добу експерименту був максимальним, та становив $(0,51 \pm 0,01)$ г/л, при контролі $(0,45 \pm 0,02)$ г/л [52, 56].

Після одноразового внутрішньочеревинного введення суспензії *E. coli* експериментальним тваринам спостерігали зміни досліджуваних показників. Концентрація С3 фрагмента комплементу була підвищена протягом усього експерименту (3-я – 7-а доба) у старих тварин на 15 % порівняно з контрольною групою, у молодих тварин концентрація С3 фрагмента комплементу в сироватці крові була значно знижена й максимальне зниження цього показника було на 5-у добу експерименту, і становило $(0,42 \pm 0,02)$ г/л при контролі $(0,65 \pm 0,01)$ г/л.

Зміна концентрації Ig A, M, G. Концентрація Ig A декілька відрізнялася між двома віковими контрольними групами і становила у 3 місячних – $(4,90 \pm 0,11)$ г/л та у 22 місячних – $(5,80 \pm 0,23)$ г/л. Сироваткові концентрації Ig M та G не відрізнялися у молодих та старих контрольних тварин (табл. 3.8).

Таблиця 3.8

Показники Ig класів А, М, G в сироватці крові контрольних тварин різного віку

№ групи	Вік тварин (n=4)	Сироватковий показник, г/л (M±m)		
		Ig A	Ig M	Ig G
КГ I	3 міс	4,90±0,11	3,20±0,38	70,4±1,2
КГ II	22 міс	5,80±0,23	3,20±0,38	70,7±1,2

У групі експериментальних тварин, яких інфікували введенням антигена *P. aeruginosa* виявили відмінності показників адаптивного гуморального імунітету порівняно з контролем (табл. 3.9).

Таблиця 3.9

Зміна концентрації імуноглобулінів класів А, М, G в сироватці крові експериментальних тварин різного віку з моделлю запалення, індукованого введенням *P. aeruginosa*

№ групи	Вік тварин (n=6)	Вміст імуноглобулінів, г/л (M±m)		
		Ig A	Ig M	Ig G
3-я доба				
ЕГ III	3 міс	6,40±0,34*	3,70±0,40	72,4±1,2
ЕГ IV	22 міс	6,30±0,33*	3,80±0,40	73,4±1,3
5-а доба				
ЕГ III	3 міс	3,90±0,10	3,70±0,40	89,7±3,8*
ЕГ IV	22 міс	4,90±0,31	4,10±0,42	101,7±5,2*
7-а доба				
ЕГ III	3 міс	5,20±0,25	4,10±0,42*	84,8±3,8
ЕГ IV	22 міс	6,10±0,13	4,40±0,44*	81,6±3,2

Після введення *P. aeruginosa* концентрація Ig A була знижена в експериментальних тварин обох вікових груп лише на 5-у добу експерименту, на 3-ю і 7-у добу експерименту рівень Ig A був вище контрольних значень як у старих, так і у молодих тварин.

Концентрація Ig M у двох вікових групах тварин збільшувалася в усі терміни обстеження (3-7 доба), та максимальне збільшення показників ми спостерігали на 7-у добу [56].

У молодих та старих експериментальних тварин виявили достовірне збільшення сироваткових показників Ig G, особливо на 5-у добу експерименту Ig G був найвищим і становив у 3 місячних – $(89,7 \pm 3,8)$ г/л та у 22 місячних – $(101,7 \pm 5,2)$ г/л

Після введення суспензії *E. coli* експериментальним тваринам об'ємом 1,5 мл спостерігали зміни досліджуваних показників різної спрямованості.

Концентрація Ig A у 22 місячних експериментальних тварин не достовірно знижувалася лише на 5-у добу експерименту. Максимальним вміст Ig A був на 7-у добу експерименту та становив $(7,40 \pm 0,58)$ г/л, при контролі $(5,80 \pm 0,23)$ г/л. На всіх етапах експерименту спостерігалось збільшення концентрації Ig M у старих та молодих експериментальних тварин (табл. 3.9).

Максимальний показник Ig M виявили на 5-у добу експерименту у молодих експериментальних тварин, концентрація Ig M збільшувалась до $(5,70 \pm 0,50)$ г/л при контролі $(3,20 \pm 0,38)$ г/л.

Сироваткова концентрація Ig G також зростала у всі терміни експерименту в двох вікових групах тварин, та максимальне збільшення цього показника виявили на 5-у добу, і становило $(93,9 \pm 4,5)$ г/л у молодих та $(97,1 \pm 4,7)$ г/л у старих експериментальних тварин при контролі $(70,7 \pm 0,2)$ г/л.

Збільшення концентрації C3 фрагмента комплементу в сироватці крові $(0,64 \pm 0,01)$ г/л порівняно з контролем $(0,45 \pm 0,02)$ г/л виявили у старих експериментальних тварин, у молодих експериментальних тварин показник опсонізуючого гуморального фактора був знижений після дії антигенів *P. aeruginosa* та *E. coli*. Однак у молодих тварин виявили значне збільшення

концентрації Ig M на тлі зниження показника C3 фрагмента комплементу, вочевидь за рахунок споживання цього гуморального фактора в елімінації антигена [41].

У старих же експериментальних тварин більш вираженими були реакції вторинної ланки імунітету (концентрація Ig G ($101,7 \pm 5,2$) г/л при контролі ($70,7 \pm 0,2$) г/л, можливо за рахунок гуморальної ланки імунної відповіді (табл. 3.10).

Зниження сироваткового показника Ig A на 5-у добу експерименту було, вочевидь, за рахунок максимального споживання цього фактора в слизовій оболонці кишківника при внутрішньочеревинному зараженні експериментальних тварин [42, 55].

Таблиця 3.10

Зміна концентрації імуноглобулінів класів A, M, G в сироватці крові експериментальних тварин різного віку з моделлю запалення, індукованого введенням *E. coli*

№ групи	Вік тварин (n=6)	Вміст імуноглобулінів, г/л (M±m)		
		Ig A	Ig M	Ig G
3-я доба				
ЕГ V	3 міс	5,70±0,28	3,90±0,40	75,3±1,5
ЕГ VI	22 міс	6,60±0,29	4,20±0,42	73,6±1,3
5-а доба				
ЕГ V	3 міс	5,90±0,32*	5,70±0,50*	93,9±4,5*
ЕГ VI	22 міс	5,30±0,10	4,90±0,44*	97,1±4,7*
7-а доба				
ЕГ V	3 міс	5,60±0,31	5,10±0,45	93,5±4,5*
ЕГ VI	22 міс	7,40±0,58*	4,90±0,43*	89,6±3,9*

3. 4 Оцінка фізіологічних параметрів експериментальних тварин на тлі запалення, індукованого антигеном *E. coli* і введення П.

На відміну від першого етапу експерименту де вивчали два види інфекційних антигенів на другому етапі експерименту обрали більш патогенний антиген *E. coli* для того, щоб вивчити механізми дії різних імунокоректорів.

На другому етапі експерименту вивчали спільний вплив бактеріального антигена та імунокоректора, який вводили в різні терміни експерименту (табл. 3.11).

Таблиця 3.11

Динаміка зміни фізіологічних параметрів 3 і 22 місячних тварин після запалення, індукованого введенням суміші *E. coli* і застосування імунокоректора П. на різних етапах експерименту

Фізіологічний параметр n=6	Показник КГ		Показник ЕГ			
			3-я доба		7-а доба	
	3	22	3	22	3	22
Рухова активність	5,0±0,1	5,0±0,1	4,0±0,1	3,0±0,2	5,0±0,1	3,0±0,2
Температура, °C	36,8±0,1	36,8±0,1	37,0±0,2	36,8±0,1	37,0±0,2	36,8±0,1
Вага, г.	130±1	230±1	100±2	227±1	100±2	226±1
Апетит	5,0±0,1	5,0±0,1	4,0±0,1	4,0±0,1	3,0±0,2	5,0±0,1
Гемодинаміка (прискорене серцебиття)	1,0±0,1	1,0±0,1	1,0±0,1	3,0±0,2	1,0±0,1	2,0±0,1
Збільшення вологості покривів	1,0±0,1	1,0±0,1	1,0±0,1	3,0±0,2	1,0±0,1	2,0±0,1

На другому етапі експерименту вводили азоксимер бромід (імунокоректор П.), який містить маніт, повідон та природний антиоксидант бета-каротин, діючий на фагоцитуючі клітини, котрий вже широко застосовується в медичній практиці. Цей препарат вводили контрольним тваринам і тваринам із запаленням, індукованим після внутрішньочеревинного введення суспензії *E. coli*. Експериментальним тваринам препарат вводили превентивно за 48-м годин до індукції запалення та після 24-х годин системного запального процесу (після введення *E. coli*)

За експериментальними тваринами різного віку спостерігали протягом усього строку обстеження та оцінювали фізіологічні параметри поведінки експериментальних тварин різного віку на тлі запального процесу за 5-ти бальною системою.

У таблиці 3.11 показано, що у 3 місячних експериментальних тварин були знижені вага та апети, а також була збільшена температура тіла експериментальних тварин порівняно з контрольними тваринами, а у 22 місячних експериментальних тварин знижувалася рухова активність, також спостерігали появу прискореного серцебиття, задишки і вологості шкірних покривів.

Спостерігалось незначне підвищення досліджуваних показників між запальним процесом, індукованим різноманітними антигенами (*P. aeruginosa* і *E. coli*) та запальною системною реакцією після введення *E. coli* і використання імунокоректора П.

3. 5 Показники кисневонезалежного і кисневозалежного фагоцитозу нейтрофілів контрольних тварин та тварин різного віку експериментальною інфекцією після введення *E. coli* і застосування П.

Показники кисневонезалежного фагоцитозу. У контрольних тварин при введенні імунокоректора не виявили достовірних змін ФІ, ФЧ та ІЗФ між двома віковими групами тварин. Після введення П. фагоцитарна активність нейтрофілів

трохи вище, ніж після введення експериментального композитного препарату, який містить амінокислоти, нуклеотиди, ферменти, вітаміни і олігопептиди.

Перетравлююча функція нейтрофілів у молодих контрольних тварин була декілька вище ніж у старшій контрольній групі, що свідчить про вищу реактивність 3 місячних експериментальних тварин порівняно зі старшою групою експериментальних тварин (табл. 3.12).

Таблиця 3.12

Показники кисневонезалежного фагоцитозу контрольних тварин різного віку з використанням імунокоректора П.

№ групи	Вік контрольних тварин (n=4)	Показник фагоцитозу (M±m)		
		Фагоцитарний індекс (ФІ, %)	Фагоцитарне число (ФЧ, ум.од.)	Індекс завершеності фагоцитозу (ІЗФ, ум.од.)
КГ Іб	3 міс	61,00±2,50	2,56±0,02	1,44±0,04
КГ ІІб	22 міс	68,00±1,50	2,69±0,02	1,37±0,04

На тлі індукції запалення суспензією *E. coli* та використання імунокоректора П. превентивно до індукції запалення (за 48 годин) спостерігали на 3-ю добу експерименту у 22 місячних експериментальних тварин недостовірне збільшення фагоцитуючого індексу, який відображає кількість клітин, що вступили у фагоцитоз, від загального їх числа.

На завершальному етапі експерименту (7-а доба) спостерігали достовірне зниження фагоцитуючого індексу, який становив $(31,00 \pm 6,00) \%$, при контролі $(61,00 \pm 2,50) \%$ ($P > 0,05$) у 3 місячних експериментальних тварин.

Фагоцитарне число починав збільшувалось в двох вікових групах експериментальних тварин на початку експерименту. На 7-у добу експерименту виявили незначні зміни фагоцитарного числа, яке відображає середнє число

бактерій, що містяться внутрішньоклітинно, порівняно з контрольною групою тварин.

У тварин старшої групи виявили достовірне зниження індексу завершеності фагоцитозу на 7-у добу експерименту, який становив $(0,98 \pm 0,20)$ ум. од., при контролі $(1,37 \pm 0,04)$ ум. од ($P > 0,05$) (табл. 3.13).

Таблиця 3.13

Показники кисневонезалежного фагоцитозу тварин різного віку з моделлю запалення, індукованого введенням *E. coli*, і введення П. до індукції запалення

№ групи	Вік тварин (n=6)	Показник фагоцитозу (M±m)		
		Фагоцитарний індекс (ФІ, %)	Фагоцитарне число (ФЧ, ум.од.)	Індекс завершеності фагоцитозу (ІЗФ, ум.од.)
3-я доба				
ЕГ IIIб	3 міс	54,00±1,40	2,71±0,04*	1,36±0,02
ЕГ IVб	22 міс	74,00±2,50	3,66±0,90*	1,42±0,01
7-а доба				
ЕГ IIIб	3 міс	31,00±6,50*	2,35±0,06	1,47±0,01
ЕГ IVб	22 міс	59,00±2,60*	2,19±0,09	0,98±0,20*

При введенні препарату П. після 24-х годин активації запального процесу спостерігали максимальне зниження ФІ у молодих експериментальних тварин на завершальному етапі експерименту $(45,00 \pm 4,30)$ %, проти $(61,00 \pm 2,50)$ % в контролі.

ІЗФ у 3 місячних щурів, із запаленням та введенням імунокоректора П. після запального процесу, був достовірно вище контрольних величин на 7-у добу експерименту $(1,61 \pm 0,08)$ ум. од., проти $(1,44 \pm 0,04)$ ум. од. в контролі.

У 22 місячних тварин з моделлю запалення та застосування препарату П. на завершальному етапі експерименту показник перетравлюючої функції нейтрофілів був нижче, ніж у контрольних щурів протягом усього експерименту – $(1,11 \pm 0,15)$ ум. од., проти $(1,37 \pm 0,04)$ ум. од. в контролі, що свідчить про незадовільний стан фагоцитуючих клітин у тварин старшої вікової групи на тлі застосування поліоксидонію в період реконвалесценції (табл. 3.14).

Таблиця 3.14

Показники кисневонезалежного фагоцитозу тварин різного віку з моделлю запалення, індукованого введенням *E. coli* і введення П. після активації запального процесу

№ групи	Вік тварин (n=6)	Показник фагоцитозу (M±m)		
		Фагоцитарний індекс (ФІ, %)	Фагоцитарне число (ФЧ, ум.од.)	Індекс завершеності фагоцитозу (ІЗФ, ум.од.)
3-я доба				
ЕГ V б	3 міс	67,00±2,70	2,68±0,03*	1,33±0,03*
ЕГ VI б	22 міс	62,00±1,20	2,49±0,01*	1,30±0,01
7-а доба				
ЕГ V б	3 міс	45,00±4,30*	2,39±0,06*	1,61±0,08*
ЕГ VI б	22 міс	71,00±0,50	2,69±0,01	1,11±0,15*

Отримані нами дані про незавершеність реакцій фагоцитозу у 22 місячних тварин з моделлю запалення та застосування препарату П. свідчать про дисоціації процесів поглинання й перетравлення у тварин старшої групи. У експериментальних тварин молодшої групи спостерігали збільшення перетравлюючої активності нейтрофілів на пізньому етапі експерименту.

Таким чином, вирішення результату запальної системної реакції залежить від: вікових особливостей, функціонального стану факторів вродженого імунітету та етапу експерименту [54].

Показники кисневозалежного фагоцитозу. При дослідженні метаболічної активності нейтрофілів за допомогою НСТ-тесту у контрольних тварин на тлі застосування П. було виявлено більш високе значення індексу стимуляції у молодих щурів ($2,35 \pm 0,07$) % порівняно з цим показником у старшої групи тварин ($1,90 \pm 0,05$) % (табл. 3.15).

Таблиця 3.15

Показники кисневозалежного фагоцитозу контрольних тварин різного віку після введення П.

№ групи	Вік щурів (n=4)	Спонтанна та індукована активність ферменту НАДФ-Н у фагоцитах (M±m)				
		% СП	% СТ	% СЦКСП	% СЦКСТ	% ІС
контроль						
КГ I б	3 міс	37,00±2,00	72,00±3,60	0,53±0,02	1,03±0,04	2,35±0,07
КГ II б	22 міс	32,00±2,00	61,00±3,50	0,51±0,02	1,03±0,04	1,90±0,05

У 3 та 22 місячних експериментальних тварин, із запаленням та застосуванні препарату П. превентивно до індукції запалення, спостерігали достовірне збільшення стимульованого тесту порівняно з контролем на 3-ю добу експерименту. У тварин двох вікових груп середній цитохімічний коефіцієнт стимульований (СЦК ст) був вище порівняно з контролем протягом усього експерименту, що свідчить про високу інтенсивність енергетичних процесів ферментних систем фагоцитуючих клітин.

У 22 місячних експериментальних тварин спостерігали зниження індексу стимуляції, на тлі високих показників стимульованого тесту протягом усього експерименту – ($82,00 \pm 2,70$) % (3-я доба) та ($71,00 \pm 1,00$) % (7-а доба), порівняно з контролем ($61,00 \pm 3,50$) % (табл. 3.16).

При введенні імунокоректора П. після 24-х годин активації запального процесу спостерігали зниження спонтанного тесту на всіх етапах експерименту і максимальне зниження цього показника було у 22 місячних експериментальних тварин на 3-ю добу експерименту, яке становило $(19,00 \pm 7,40) \%$, проти $(32,00 \pm 2,00) \%$ в контролі

Таблиця 3.16

Показники кисневозалежного фагоцитозу експериментальних тварин різного віку з моделлю запалення, індукованого введенням *E.coli*, на тлі введення П.

№ групи	Вік щурів (n=6)	Спонтанна та індукована активність ферменту НАДФ-Н у фагоцитах (M±m)				
		% СП	% СТ	% СЦК СП	% СЦК СТ	% ІС
3-я доба						
ЕГ III б	3 міс	42,00±1,00	88,00±2,20*	0,65±0,03	1,47±0,04*	2,00±0,04
ЕГ IV б	22 м	54,00±4,20	82,00±2,70*	0,78±0,06*	1,31±0,09*	1,50±0,02
7-а доба						
ЕГ III б	3 міс	29,00±4,10*	68,00±3,10	0,36±0,07*	1,13±0,09	2,40±0,08
ЕГ IV б	22 м	41,00±3,00*	71,00±1,00*	0,55±0,01	1,47±0,10*	1,80±0,10

У експериментальних тварин двох вікових груп виявили зниження показника середнього цитохімічного коефіцієнту спонтанного (СЦК сп), порівняно з контролем протягом усього експерименту.

При цьому у 3 та 22 місячних тварин виявили збільшення ферментативної активності нейтрофілів ІС порівняно з контрольною групою тварин та з групою експериментальних тварин, яким вводили препарат П. превентивно до індукції запалення, що свідчить про наявність функціонального резерву цих імунокомпетентних клітин. Максимальне збільшення ІС спостерігалось у молодих тварин на 3-ю добу експерименту, яке становило $(3,60 \pm 0,08)$ ум. од. при контролі $(2,00 \pm 0,04)$ ум. од.

Таким чином, у експериментальних тварин двох вікових груп із запаленням, індукованим введенням антигену *E. coli*, і застосування препарату П. превентивно за 48-м годин до запалення виявили зниження показника ІС порівняно з контрольною групою тварин, що свідчить про виснаження функціонального резерву фагоцитуючих клітин у експериментальній групі 3 місячних тварин (табл. 3.17).

Таблиця 3.17

Показники кисневозалежного фагоцитозу експериментальних тварин різного віку з моделлю запалення, індукованого введенням *E.coli*, і введення П. після запалення

№ групи	Вік щурів, міс. (n=6)	Спонтанна та індукована активність ферменту НАДФ-Н у фагоцитах (М±m)				
		% СП	% СТ	%СЦКСП	% СЦК СТ	% ІС
3-я доба						
ЕГ V б	3	20,00±5,10*	67,00±1,00	0,21±0,07*	0,92±0,02	3,60±0,08*
ЕГ VI б	22	19,00±7,40*	66,00±0,50	0,29±0,08*	1,01±0,01	2,90±0,06*
7-а доба						
ЕГ Vб	3	30,00±1,70	72,00±0,01	0,39±0,06*	1,07±0,01	2,40±0,08
ЕГ VIб	22	31,00±0,05	68,00±0,10	0,39±0,09*	1,17±0,06*	2,20±0,08

П. є антогоністом окислювального процесу, тому доцільним буде застосовувати даний препарат після активації запального процесу, тому що відбувається домінування витрати імунокоректора на запальний процес, особливо на ранньому етапі експерименту (3-я доба). Цей препарат раціонально використовувати на тлі запальної системної реакції, тому що він виявився ефективним для активації фагоцитозу нейтрофілів за допомогою сінглетних активних форм кисню [54].

3. 6 Динаміка зміни концентрації ЦІК і вміст СЗ фрагмента комплементу тварин різного віку з запаленням, індукованим *E. coli*, після введення П.

Показники ЦІК. Введення препарату П. контрольним тваринам значно збільшило концентрацію ЦІК як у молодих, так і у старих експериментальних тварин порівняно з контрольними тваринами, яким вводили фізіологічний розчин.

У 3 місячних контрольних тварин після введення П. спостерігали збільшення вмісту циркулюючих імунних комплексів на 20 % порівняно зі старшою контрольною групою тварин (рис. 3.4).

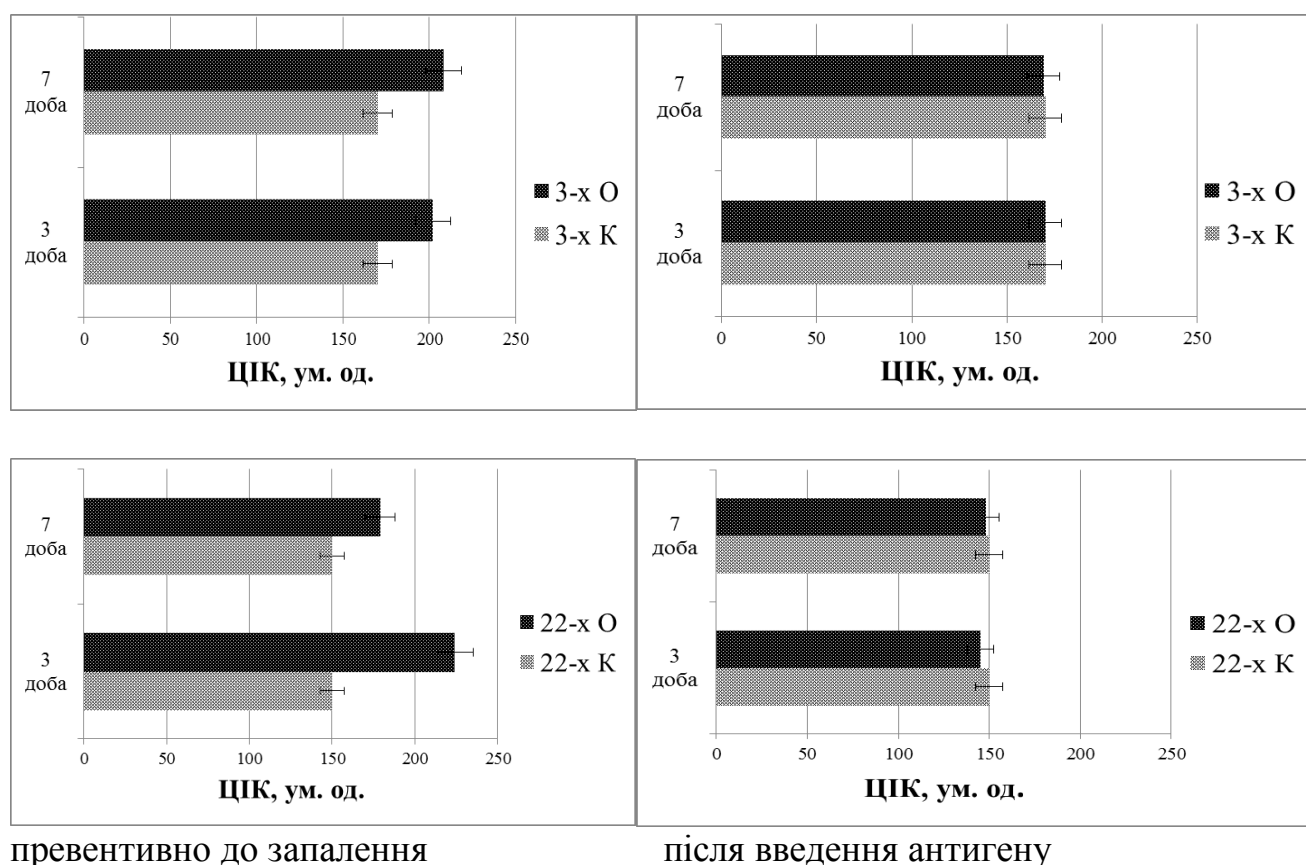


Рис. 3.4 Концентрація ЦІК тварин різного віку із запаленням, індукованим бактеріальною суспензією *E. coli*, і стимуляцією П.

Введення імунокорегуючого препарату П. превентивно за 48-м годин до індукції запалення суспензією *E. coli* призвело до збільшення вмісту ЦІК у молодих тварин на 7-у добу експерименту, який становив $(208,0 \pm 2,0)$ ум. од., при

контролі ($170,0 \pm 1,0$) ум. од. У тварин старшої групи концентрація ЦІК була висока на 3-ю добу дослідження та становила ($224,0 \pm 13,0$) ум. од., при контролі ($150,0 \pm 0,5$) ум. од.

При введенні препарату П. превентивно до індукції запалення бактеріальною суспензією *E. coli* виявили збільшення вмісту ЦІК у молодих та старих експериментальних тварин. У експериментальних тварин, яким вводили П. після активації системного запального процесу концентрація ЦІК була на рівні контрольних значень, отже поліоксидоній доцільно використовувати після індукції запалення мікроорганізмами, тому що він є антиоксидантом [46].

Вміст та споживання С3 фрагмента комплементу. В ході дослідження ми виявили відмінності сироваткових показників вродженої гуморальної ланки імунної відповіді між молодими та старими контрольними й експериментальними тваринами. У молодих контрольних тварин концентрація С3 фрагмента комплементу була на 10 % вище порівняно зі старшою групою.

Після внутрішньочеревинного введення суспензії *E. coli*, що містить 10^9 КУО / мл та імуномодулятора П. виявили достовірні зміни в досліджуваних групах експериментальних тварин (рис. 3.5). У молодих експериментальних тварин концентрація опсинізуючого гуморального фактора С3 фрагмента комплементу була знижена протягом усього експерименту незалежно від терміну введення імуномодулятора. Максимальне достовірне зниження процентного вмісту С3 фрагмента комплементу було на 7-у добу експерименту на тлі застосування препарату П. превентивно до індукції запалення, яке становило ($0,34 \pm 0,06$) г/л, при контролі ($0,54 \pm 0,02$) г/л.

У 22 місячних експериментальних тварин навпаки цей показник був вище контрольних значень. Концентрація С3 фрагмента комплементу в сироватці крові була максимально збільшена на 3-ю добу експерименту на тлі застосування імуномодулятора П. та на 7-у добу експерименту при введенні препарату після індукції запального процесу.

У молодшій групі експериментальних тварин концентрація С3 фрагмента комплементу була знижена, вочевидь, за рахунок споживання цього гуморального фактора в елімінації антигена.

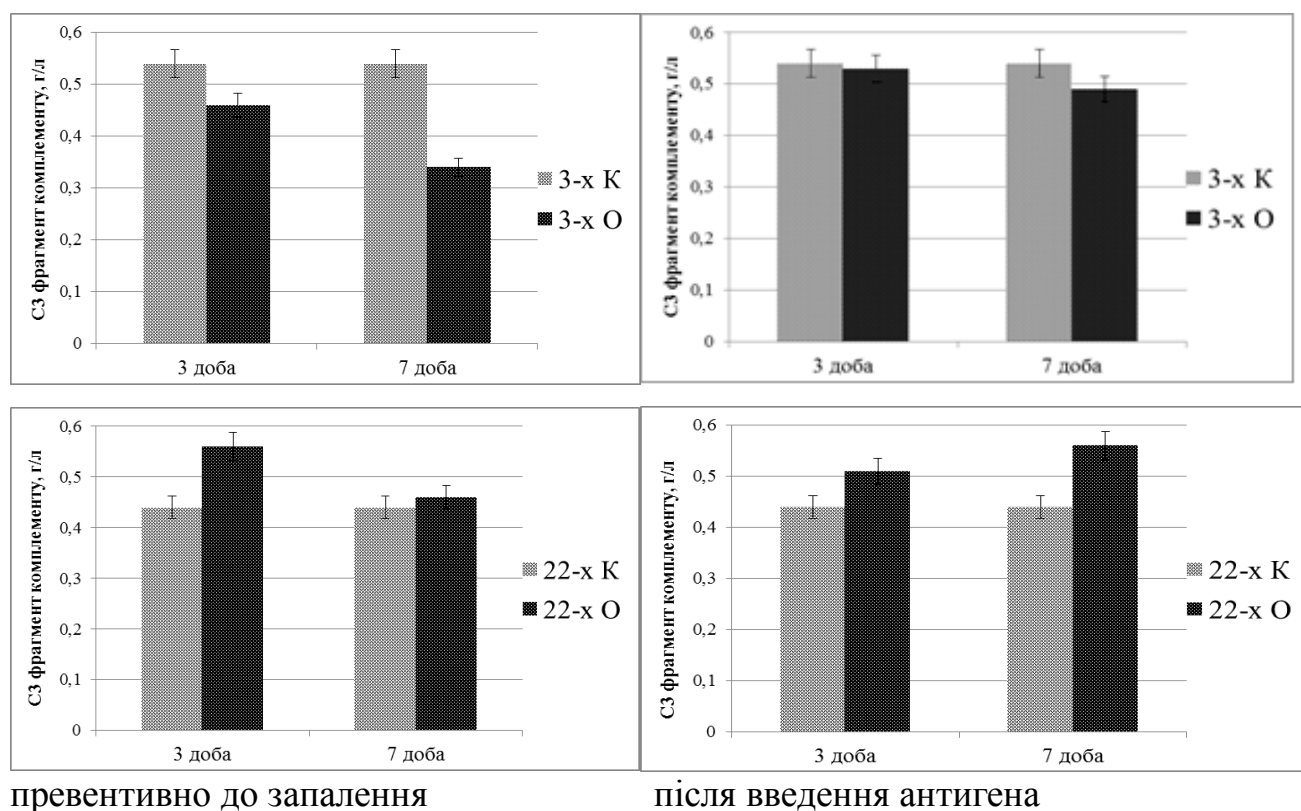


Рис. 3.5 Зміна вмісту С3 фрагмента комплементу тварин різного віку із запаленням, індукованим *E. coli*, і стимуляцією П.

Імунорезистентність старшої групи експериментальних тварин визначали за споживанням та вмістом вродженого гуморального фактора імунітету С3 фрагмента комплементу на тлі введення імуномодуючого препарату П. Цей показник незалежно від терміну введення імунопрепарату був вище контрольних значень, мабуть за рахунок придбаного адаптивного імунітету [48].

3. 7 Оцінка фізіологічних параметрів експериментальних тварин на тлі запалення, індукованого антигеном *E. coli*, і введення М.

Іншій групі експериментальних тварин різного віку на другому етапі

дослідження вводили експериментальний композитний препарат М., що складається з амінокислот, нуклеотидів, ферментів, вітамінів і олігопептидів.

Протягом усього експерименту досліджували морфометричні зміни поведінки контрольних та експериментальних тварин на тлі застосування композитного препарату М. (табл. 3.18).

Таблиця 3.18

Динаміка зміни фізіологічних параметрів 3 і 22 місячних тварин після запалення, індукованого введенням суміші *E. coli* і застосування імунокоректора М. на різних етапах експерименту

Фізіологічний параметр n=6	Показник КГ		Показник ЕГ			
	3	22	3-я доба		7-а доба	
	3	22	3	22	3	22
Рухова активність	5,0±0,1	5,0±0,1	4,0±0,1	2,0±0,2	4,0±0,1	3,0±0,2
Температура, °С	36,8±0,1	36,8±0,1	37,0±0,2	36,8±0,1	37,0±0,2	36,8±0,1
Вага, г.	130±1	230±1	105±2	230±1	110±2	229±1
Апетит	5,0±0,1	5,0±0,1	4,0±0,1	4,0±0,1	3,0±0,1	5,0±0,1
Гемодинаміка (прискорене серцебиття)	1,0±0,1	1,0±0,1	1,0±0,1	3,0±0,2	1,0±0,1	3,0±0,2
Збільшення вологості покривів	1,0±0,1	1,0±0,1	1,0±0,1	3,0±0,2	1,0±0,1	3,0±0,2

У таблиці 3.18 показано, що у 3 місячних експериментальних тварин були знижені параметри ваги й апетиту, а також була збільшена температура тіла експериментальних тварин порівняно з контрольними тваринами, а у 22 місячних

експериментальних тварин знижувалася рухова активність, також спостерігали появу прискореного серцебиття, задишки й вологості шкірних покривів. Спостерігали незначне підвищення досліджуваних показників між запальним процесом, індукованим різноманітними антигенами (*P. aeruginosa* і *E. coli*) та запальною системною реакцією після введення *E. coli* і використання імунокоректора М.

3. 8 Показники кисневонезалежного і кисневозалежного фагоцитозу нейтрофілів контрольних та експериментальних тварин різного віку з моделлю запалення, індукованого введенням *E. coli*, на тлі застосування М.

Показники кисневонезалежного фагоцитозу. Результати дослідження показали, що у контрольних тварин обох вікових груп після введення експериментального композитного препарату М. не виявлено достовірних відмінностей між фагоцитуючим індексом, фагоцитуючим числом та перетравлюючою здатністю нейтрофілів (табл. 3.19).

Таблиця 3.19

Показники кисневонезалежного фагоцитозу контрольних тварин різного віку після одноразового введення імунокоректора М.

№ групи	Вік тварин (n=4)	Показник фагоцитозу (M±m)		
		Фагоцитарний індекс (ФІ, %)	Фагоцитарне число (ФЧ, ум.од.)	Індекс завершеності фагоцитозу (ІЗФ, ум.од.)
КГ I а	3 міс	55,00±1,50	2,19±0,02	1,22±0,03
КГ II а	22 міс	57,00±1,50	2,21±0,02	1,01±0,01

Після застосування імунокоректора М. до індукції запалення виявили значне зниження фагоцитарного індексу у 3 місячних тварин на 3-ю добу

експерименту, який становив $(20,00 \pm 5,40)$ % при $(55,00 \pm 1,50)$ % в контролі. Але на 7-у добу експерименту даний показник був вище контрольних показників $(62,00 \pm 0,10)$ % (таб. 3.20).

Таблиця 3.20

Показники кисневонезалежного фагоцитозу тварин різного віку з моделлю запалення, індукованого сумішшю *E. coli*, при введенні М. до формування запалення

№ групи	Вік щурів (n=6)	Показник фагоцитозу (M±m)		
		Фагоцитарний індекс (ФІ, %)	Фагоцитарне число (ФЧ, ум.од.)	Індекс завершеності фагоцитозу (ІЗФ, ум.од.)
3-я доба				
ЕГ III а	3 міс	20,00±5,40*	1,73±0,03*	0,93±0,05*
ЕГ IV а	22 міс	60,00±1,00	2,01±0,04	1,06±0,01
7-а доба				
ЕГ III а	3 міс	62,00±0,10	2,44±0,02	1,09±0,07
ЕГ IV а	22 міс	34,00±3,40*	1,94±0,02*	1,32±0,09*

Під час дослідження виявили достовірне зниження ІЗФ у молодих експериментальних тварин на 3-ю добу обстеження – $(0,93 \pm 0,05)$ ум. од. при $(1,22 \pm 0,03)$ ум. од. в контролі ($P > 0,05$), а у тварин старшої вікової групи навпаки спостерігали підвищення перетравлюючої здатності нейтрофілів на завершальному етапі експерименту, яке становило $(1,32 \pm 0,09)$ ум. од. при $(1,01 \pm 0,01)$ ум. од. в контролі ($P < 0,05$).

При введенні препарату П. на тлі запалення (після 24-х годин) спостерігали тенденцію збільшення ІЗФ у 22 місячних експериментальних тварин протягом усього експерименту та максимальним цей показник був на 3-ю добу експерименту $(1,35 \pm 0,09)$ % при $(1,01 \pm 0,01)$ % в контролі.

Таким чином, на моделі індукованого запального процесу після введення *E. coli* та застосування експериментального імунокорегуючого препарату М. на різних етапах експерименту спостерігали пригнічення клітинної ланки імунітету тільки у 3 місячних експериментальних тварин (табл. 3.21).

Таблиця 3.21

Показники кисневонезалежного фагоцитозу тварин різного віку з моделлю запалення, індукованого сумішшю *E. coli*, і введення М. після активації запального процесу

№ групи	Вік щурів (n=6)	Показник фагоцитозу (M±m)		
		Фагоцитарний індекс (ФІ, %)	Фагоцитарне число (ФЧ, ум.од.)	Індекс завершеності фагоцитозу (ІЗФ, ум.од.)
3-я доба				
ЕГ V а	3 міс	42,00±2,00*	2,43±0,02	1,38±0,02
ЕГ VI а	22 міс	51,00±2,00	2,34±0,02	1,35±0,09*
7-а доба				
ЕГ V а	3 міс	53,00±0,10	2,13±0,01	1,07±0,06
ЕГ VI а	22 міс	53,00±0,10	2,14±0,01	1,18±0,04

У 22 місячних тварин, навпаки, введення експериментального препарату М. у різні терміни експерименту на тлі запального процесу, індукованого введенням суспензією *E. coli*, призвело до активації фагоцитуючих клітин і стимуляції імунної відповіді.

Стимуляція фагоцитозу (ІЗФ) відбувалася більш інтенсивно у тварин старшої групи при дії імунокоректора М. до та після запального процесу, індукованого введенням *E. coli*. З цього випливає, що прооксидантну дію М. сприятливим чином більш використовують 22 місячні експериментальні тварини [45, 49].

Показники кисневозалежного фагоцитозу. Під час експерименту виявили, що інтенсивність ферментативної активності нейтрофілів у контрольних молодих тварин у 2 рази перевищувала показники індексу стимуляції порівняно зі старшими контрольними тваринами, що свідчить про високу імунореактивність 3 місячних тварин (таб. 3.22).

Таблиця 3.22

Показники кисневозалежного фагоцитозу контрольних тварин різного віку після введення М.

№ групи	Вік щурів (n=4)	Спонтанна та індукована активність ферменту НАДФ-Н у фагоцитах (M±m)				
		% СП	% СТ	% СЦК СП	% СЦК СТ	% ІС
контроль						
ЕГ I а	3 міс	47,00±2,50	63,00±3,50	0,82±0,02	1,03±0,04	2,21±0,07
ЕГ II а	22 м	61,00±3,60	70,00±3,70	0,99±0,03	0,84±0,03	1,09±0,05

Індукція бар'єрних вроджених факторів імунітету залежить від функціонального стану внутрішньоклітинних ферментів фагоцитуючих клітин.

Після запалення, індукованого введенням бактеріальної суспензії *E. coli* та застосування експериментального препарату М. превентивно до індукції запалення виявили на 3-ю добу у молодих експериментальних тварин достовірне збільшення показника спонтанного тесту в 1,7 рази та стимульованого тесту зимозаном в 1,2 рази порівняно з контролем, що також призвело до зниження ферментативної активності нейтрофілів, що свідчить про незадовільний стан бактерицидної системи клітин тільки на ранньому етапі запалення.

У експериментальних тварин старшого віку на всіх етапах експерименту виявили збільшення ферментативної активності фагоцитуючих клітин (ІС).

У період реконвалесценції (7-а доба) спостерігали достовірне збільшення показника ІС у двох вікових групах експериментальних тварин. Максимальне

збільшення ІС було у 3 місячних тварин при введенні М. превентивно до індукції запалення – $(2,90 \pm 0,05) \%$ при контролі $(2,21 \pm 0,07) \%$, а у 22 місячних тварин при введенні М. після індукції запалення, яке становило $(2,25 \pm 0,16) \%$ при $(1,09 \pm 0,05) \%$ у контролі (табл. 3.23).

Таблиця 3.23

Показники кисневозалежного фагоцитозу нейтрофілів експериментальних тварин різного віку з моделлю запалення, індукованого введенням *E.coli* на тлі введення М.

№ групи	Вік щурів (n=6)	Спонтанна та індукована активність ферменту НАДФ-Н у фагоцитах (M±m)				
		% СП	% СТ	% СЦК СП	% СЦК СТ	% ІС
3-я доба						
ЕГ IIIa	3 міс	80,00±7,50*	78,00±4,70*	1,03±0,02*	1,17±0,07*	0,97±0,04*
ЕГ IVa	22 м	36,00±8,30*	56,00±3,70*	0,55±0,04	0,84±0,01	1,53±0,03
7-а доба						
ЕГ IIIa	3 міс	52,00±1,10*	76,00±4,50*	0,30±0,04*	1,46±0,15*	2,90±0,05*
ЕГ IVa	22 м	34,00±8,00*	63,00±1,50	0,51±0,03*	0,86±0,01	2,10±0,13*

У 3 місячних тварин на тлі експериментального запального процесу та застосування М. після активації системного запального процесу, індукованого введенням *E. coli* показник ІС був достовірно знижений лише на 3-ю добу експерименту, що свідчить про виснаження функціонального резерву фагоцитуючих клітин, а також про зниження метаболічного резерву фагоцитів на ранньому етапі запалення.

Під час дослідження виявили у 22 місячних експериментальних тварин після введення М. на тлі запалення в 1,5 рази підвищення інтенсивності енергетичних процесів ферментних систем фагоцитуючих клітин, яку відображає середній цитохімічний коефіцієнт (табл. 3.24).

Таблиця 3.24

Показники кисневозалежного фагоцитозу нейтрофілів експериментальних тварин різного віку з моделлю запалення, індукованого введенням *E.coli* і введення М. після запалення

№ групи	Вік щурів (n=6)	Спонтанна та індукована активність ферменту НАДФ-Н у фагоцитах (M±m)				
		% СП	% СТ	СЦК СП	СЦК СТ	% ІС
3-я доба						
ЕГ Va	3 міс	31,00±3,60*	49,00±1,10*	0,51±0,01	0,76±0,03*	1,61±0,02*
ЕГ VIa	22 м	47,00±5,20*	77,00±1,10	0,67±0,09	1,33±0,09*	1,65±0,09
7-а доба						
ЕГ Va	3 міс	30,00±3,60*	57,00±1,60*	0,57±0,01	0,90±0,04	2,35±0,01
ЕГ VIa	22 м	38,00±9,10*	75,00±1,10	0,52±0,03	1,24±0,07*	2,25±0,16*

У старшій групі тварин на тлі запалення та введення експериментального композитного препарату М. ферментативна активність фагоцитируючих клітин у НСТ-тесті протягом усього експерименту була збільшена, особливо на 7-у добу спостереження, що свідчить про наявність функціонального резерву цих імунокомпетентних клітин у присутності імунокоректора [51, 54].

3. 9 Динаміка зміни концентрації ЦІК і вміст С3 фрагмента комплементу тварин різного віку з запаленням, індукованим *E. coli* після введення М.

Показники ЦІК. Введення пептидного препарату М. контрольним тваринам значно збільшило концентрацію ЦІК як у молодих, так і у старих експериментальних тварин порівняно з контрольними тваринами, яким вводили фізіологічний розчин.

У 22 місячних контрольних тварин після введення комбінованого препарату М. спостерігали підвищення на 40 % вмісту СЗ фрагмента комплементу порівняно з 3 місячними контрольними тваринами (рис. 3.6).

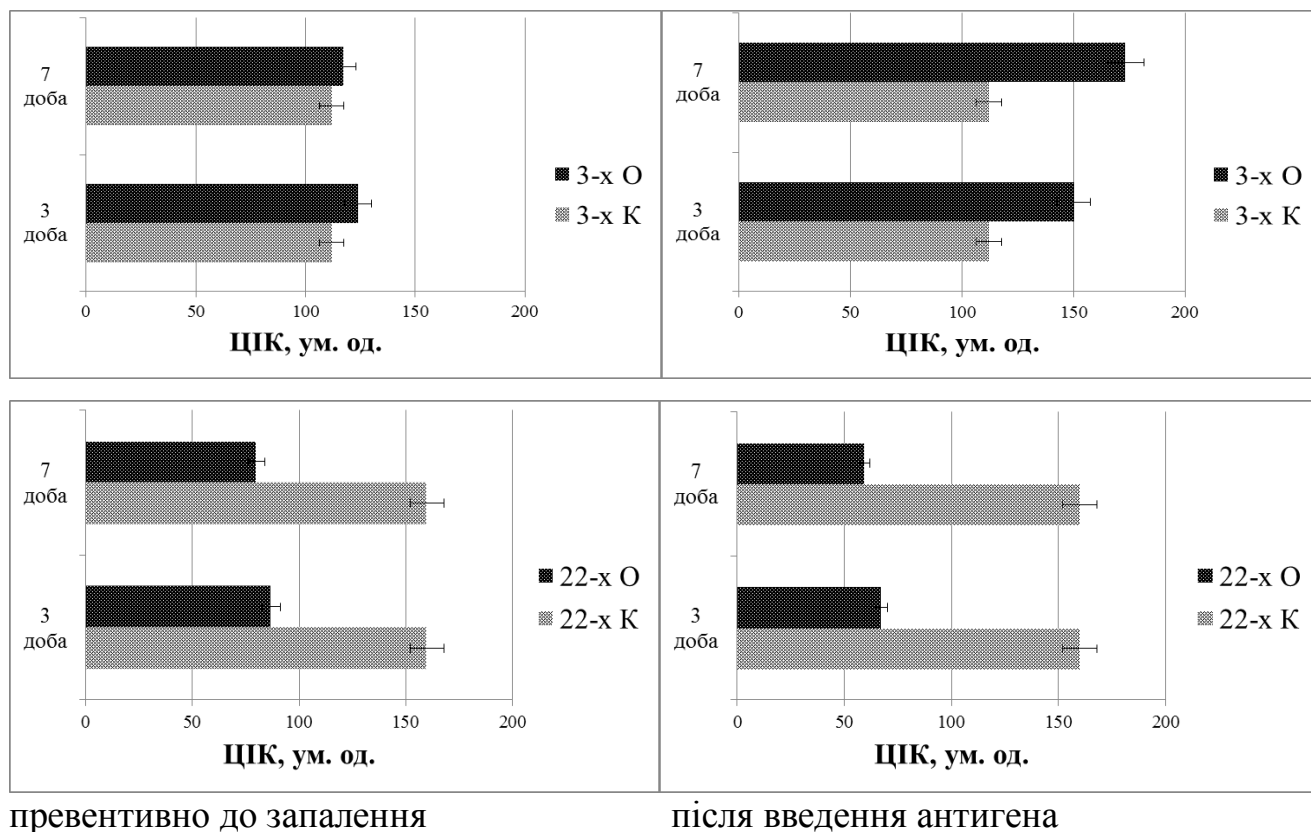


Рис. 3.6 Зміна концентрації ЦК тварин різного віку із запаленням, індукованим *E. coli* і стимуляцією М.

Введення імунокорегуючого препарату М. превентивно до та після індукції запалення суспензією *E. coli* призвело до зниження вмісту ЦК у 22 місячних тварин. У молодих експериментальних тварин, навпаки, введення імунокоректора М. призвело до достовірного збільшення концентрації ЦК, особливо на 7-у добу дослідження, яка становила $(173,0 \pm 19,0)$ ум. од. при контролі $(112,0 \pm 4,0)$ ум. од.

Концентрація ЦК після введення М., на тлі запальної реакції, була знижена у тварин старшої групи за рахунок того, що достатній рівень клітинної та гуморальної ланки імунітету забезпечили максимальну елімінацію антигенів, що не сприяло утворенню комплексів антиген-антитіло [44].

Вміст та споживання С3 фрагмента комплементу. Важливою сполучною ланкою між формуванням вроджених імунних реакцій та специфічного адаптивного імунітету є білки системи комплементу.

Введення пептидного препарату М. контрольним тваринам призвело до зменшення концентрації С3 фрагмента комплементу, як у молодих, так і у старих тварин порівняно з контрольними тваринами, яким вводили фіз. розчин (рис. 3.7).

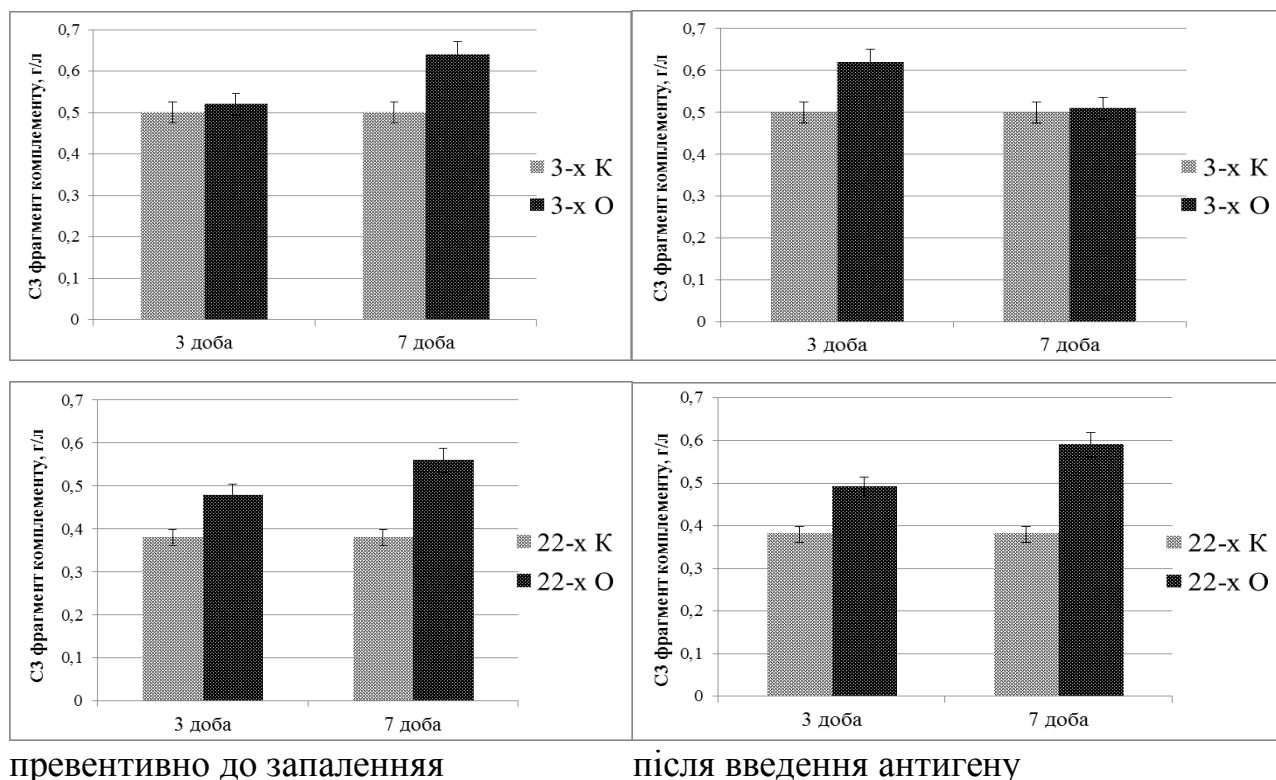


Рис. 3.7 Вміст С3 фрагмента комплементу тварин різного віку із запаленням, індукованим *E. coli*, і стимуляцією М.

Під час дослідження виявили у молодих контрольних тварин після введення імунокоректора М. збільшення в 1,5 рази концентрації С3 фрагмента комплементу порівняно зі старшою контрольною групою.

Введення імунокорегуючого композитного пептидного препарату М. у різні терміни експерименту на тлі запалення, індукованого введенням антигену *E. coli* значно збільшило концентрацію С3 фрагмента комплементу в обох вікових групах експериментальних тварин протягом усього терміну обстеження.

Таким чином, гуморальна ланка вродженого імунітету знижувалася тільки у молодих експериментальних тварин після індукції запалення антигеном *E. coli*. Введення імунокорегуючого препарату М. у різні терміни запалення призвело до збільшення концентрації С3 фрагмента комплементу експериментальних тварин двох вікових категорій, що свідчить про взаємовплив реактивності і резистентності тварин у присутності імунокоректора [144].

Висновки до розділу 3

В цьому розділі наведені експериментальні дослідження вродженого та адаптивного імунітету контрольних та експериментальних тварин різного віку, а також використання різних імунокоректорів на тлі запалення.

Недостатню увагу приділено віковим відмінностям адаптаційних можливостей організму. Отримані дані про зміни метаболічного стану, рівня експресії генів, функції імунної та нейроендокринної систем при старінні змушують припустити про наявність різної здатності до адаптації молодих та старих організмів. Тварини різного віку у відповідь на дію інфекції по-різному змінюють інтенсивність і спрямованість метаболічних реакцій.

В останнє десятиліття досягнення теоретичної та практичної геронтології дозволило здійснити цілеспрямовану регуляцію вікових змін. Виходячи з цього, одним із пріоритетних завдань сучасної геронтології є профілактика прискорення старіння й вікової патології, спрямована на збільшення середньої тривалості життя, збереження активного довголіття й досягнення видової межі життя людини.

Імунна охорона внутрішнього середовища організму від чужорідних інфекційних і неінфекційних агентів здійснюється шляхом взаємодії багатьох клітинних та гуморальних факторів імунітету. Клітини імунної системи та гуморальні продукти їхньої життєдіяльності забезпечують вроджені та антигенспецифічні реакції імунної системи.

Розвиток концепції адаптогенеза неможливий без урахування онтогенетичних особливостей індукції вроджених і адаптивних факторів резистентності. Тому сьогодні ми вивчали етапи формування механізмів резистентності при індукованих запальних процесах в експерименті на тваринах різного віку та застосування імунокоректорів на тлі запального процесу.

Генералізовані і локальні зміни імунофізіологічних реакцій призводять до поступового формування патологічних процесів в організмі. Порушення центральної гемодинаміки й мікроциркуляції в абдомінальній зоні призводить до накопичення токсичних факторів різної природи, викликаючи вазоконструкцію на тлі надлишкової інтоксикації внаслідок мікробної контамінації, накопичення мікробних токсинів та старіючих клітин.

Одним з розповсюджених агентів запальних реакцій є грамнегативні бактерії, які екранують свій пептидоглікан від факторів імунного захисту господаря за допомогою ЛПС, якому відводиться важливе значення в механізмах розвитку запальних процесів. Поліфункціональність ЛПС пов'язують з індукцією синтезу низки медіаторів; ЛПС здійснює антибактеріальний захист (при його невеликих концентраціях), тим не менш, потрапляння значних кількостей у кров призводить до ускладнення перебігу запального процесу – різко порушується мікроциркуляція у вогнищі запалення (виникає спазм судин); він впливає на проникність внутрішньоклітинних та позаклітинних мембран, у тому числі й лізосомальних, стимулює біоушкоджуючий потенціал нейтрофілів (лізосомальні ферменти і токсичні форми кисню); різко знижує бар'єрні функції епітелію як через низку медіаторів, так і безпосередньо діючи на судинний ендотелій.

У вродженому захисті людини та тварин від патогенних і непатогенних чужорідних агентів величезне значення мають клітини, здатні до фагоцитозу, а також клітини, що володіють цитотоксичною активністю.

Імунна перебудова організму проявляється збільшеною стійкістю його по відношенню до інфекції, накопиченням у крові антиген-специфічних лімфоцитів й антитіл, формуванням підвищеної чутливості уповільненого типу та інших, так званих, «клітинних імунних реакцій».

Важливою сполучною ланкою між формуванням вродженої імунної реакції та специфічного адаптивного імунітету є білки системи комплементу. Білки системи комплементу містяться в сироватці крові і є активними компонентами, які володіють властивостями естераз, руйнують оболонки клітин тварин та мікроорганізмів, а також активують інші фактори резистентності, зокрема фагоцитоз і функцію імуноглобулінів.

Реакції адаптивного гуморального імунітету формуються за рахунок утворення специфічних антитіл, якими є три основні класи імуноглобулінів. Концентрація імуноглобулінів у сироватці крові є результатом встановлення рівноваги між синтезом та розпадом. При взаємодії антигена, специфічного імуноглобуліну (антитіла) й комплементу утворюються високомолекулярні комплекси.

Проведені нами дослідження з оцінки показників вродженої імунореактивності й імунорезистентності, а також гуморальних показників адаптивного імунітету виявили різні імунні реакції у молодих та старих тварин у залежності від виду антигена, від терміну дослідження та від виду імунокоректора.

Під час дослідження спостерігали відмінності показників вродженого імунітету контрольних тварин різного віку після введення фізіологічного розчину та застосування різних імунокоректорів (поліоксидонію та міксфактора). У контрольній молодшій групі індукційний окислювальний резерв фагоцитуючих клітин у НСТ-тесті був вище ніж у старшої групи. Показники кисневонезалежного й кисневозалежного фагоцитозу та вміст опсонізуючого фактора фагоцитозу C3 фрагмента комплементу були вище у 3 місячних контрольних тварин порівняно зі старшою контрольною групою, що свідчить про їхню високу реактивність. При дослідженні показників адаптивного імунітету виявили, що вміст Ig M і G не відрізнявся у контрольних тварин різного віку, а концентрація Ig A була вище у старшій віковій групі контрольних тварин порівняно з молодшими тваринами. Утворення циркулюючих імунних комплексів у 3 місячних контрольних тварин було в 2 рази вище, ніж у контрольних 22 місячних тварин.

На фоні запального процесу, індукованого в експериментальних тварин різного віку грамнегативними мікроорганізмами *P. aeruginosa* і *E. coli* було виявлено різний ступень зниження показників кисневонезалежного фагоцитозу протягом усього терміну обстеження. У 3 місячних експериментальних тварин спостерігали зниження вмісту гуморальної ланки вродженого імунітету протягом усього експерименту.

Після введення різних інфекційних антигенів *P. aeruginosa* і *E. coli* спостерігали достовірні збільшення концентрації Ig A, M і G (адаптивного імунітету) у тварин двох вікових груп на всіх етапах експерименту, крім Ig A на 5-у добу експерименту, вочевидь за рахунок споживання цього гуморального фактора в слизовій оболонці кишківника при внутрішньочеревинному зараженні експериментальних тварин. Після дії бактеріальних суспензій *P. aeruginosa* та *E. coli* інтенсивність утворення ЦІК між антигеном і імуноглобуліном була достовірно збільшена протягом усього експерименту у тварин двох вікових категорій, що свідчить про активацію зв'язування імуноглобулінами бактерій.

Після дії патогена *E. coli* виявили більш негативний вплив на досліджувані показники імунітету. У 3 місячних експериментальних тварин під час експерименту виявили виражене зниження імунорезистентності вродженої ланки імунітету порівняно зі старшою групою експериментальних тварин на вплив бактеріального збудника *E. coli*.

Під час дослідження було виявлено, що на тлі запального процесу, індукованого введенням *E. coli*, та застосування імунокоректора П. через 24-и години після активації запалення інфекційним антигеном у експериментальних тварин двох вікових груп достовірно збільшувалася індукційна ферментативна активність гранулоцитарних нейтрофілів у НСТ-тесті, особливо на ранніх термінах запалення, а застосування поліоксидонію превентивно до введення антигену *E. coli*, навпаки, викликало інгібування кисневонезалежного фагоцитозу. Таким чином П. слід застосовувати після активації запальної реакції тому що цей препарат має виражену антиоксидантну активність, що є негативним для

забезпечення фагоцитозу нейтрофілів за допомогою активних форм кисню, який забезпечує ендоцитоз бактеріальних антигенів.

При застосуванні композитного експериментального препарату М. після дії патогена *E. coli* у тварин двох вікових груп спостерігали іншу реакцію у вигляді стимуляції активності фагоцитозу та збільшення концентрації С3 фрагмента комплементу, який має виражену опсонізуючу дію, що свідчить про адаптивний зв'язок процесів реактивності й резистентності експериментальних тварин різного віку. Застосування імунокоректора М. превентивно до інфікування *E. coli* у молодих експериментальних тварин призводило до достовірного зниження активності фагоцитозу, особливо на 3-ю добу експерименту, але в старшій віковій експериментальній групі тварин на тлі бактеріального зараження *E. coli* відбувалася активація кисневонезалежного і кисневозалежного фагоцитозу нейтрофілів паротягом усього експерименту.

Результат запалення експериментальних тварин залежить від: стадії запального процесу, вікових особливостей експериментальних тварин, виду антигена, який індукував запальний процес та різновиду імунокоректора.

Таким чином, зі збільшенням віку імунні реакції організму на інфекційні антигени відрізняються від таких у молодих організмів, однак це не завжди слід трактувати як зниження адаптаційного потенціалу. Найімовірніше, з віком змінюється стратегія адаптації, а не здатність організму до неї.

Результати досліджень цього розділу наведено в таких публікаціях [40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 144].

ВИСНОВКИ

Дані, які були отримані в процесі комплексного обстеження експериментальних тварин різного віку після дії мікробних антигенів *P. aeruginosa* і *E. coli* включають показники гуморального і клітинного вродженого і вторинного адаптивного імунітету, які мають велике теоретичне значення для з'ясування механізмів порушення функції регуляторних систем організму в залежності від віку. Результати дослідження можуть бути корисні не тільки для медичної практики, а й мають величезне значення в розкритті та розумінні інтегральних фізіологічних процесів, що забезпечують реактивність і резистентність організму в онтогенезі.

1. Виявили відмінності імунореактивності деяких показників вродженого імунітету контрольних тварин в залежності від віку. Показники вродженого імунітету (кисневонезалежний і кисневозалежний фагоцитоз, вміст C3 фрагмента комплементу) у 22 місячних тварин знижені порівняно з 3 місячними. У контрольній групі молодих тварин індукційний окислювальний резерв фагоцитуючих клітин у НСТ-тесті був вище, ніж у старих контрольних тварин. Виявили, що показники гуморального імунітету (вміст Ig A, M, G) достовірно не відрізнялися у контрольних тварин різного віку. Утворення циркулюючих імунних комплексів у 3 місячних контрольних тварин було в 2 рази вище ($P > 0,05$), ніж у контрольних 22 місячних тварин.

2. Інфікування тварин *P. aeruginosa* і *E. coli* індукувало схожі зміни імунної відповіді у молодих і старих тварин, що проявлялося багаторазовим збільшенням ЦІК у крові, зміною вмісту C3 фрагмента комплементу, пригніченням показників кисневонезалежної фагоцитарної активності і зміною показників кисневозалежного фагоцитозу з вираженою стимуляцією НАДФН-оксидази у старих тварин.

3. У молодих експериментальних тварин після введення *E. coli* виявили більш виражене пригнічення факторів вродженого імунітету (фагоцитарної активності нейтрофілів і вміст C3 фрагмента комплементу) порівняно зі старими

тваринами. У молодих тварин *E. coli* знижувала вроджений імунітет більш виражено, ніж *P. aeruginosa*.

4. Після введення різних інфекційних антигенів *P. aeruginosa* і *E. coli* спостерігали достовірні збільшення вмісту всіх класів імуноглобулінів у тварин двох вікових груп на всіх етапах експерименту. Але Ig A на 5-у добу експерименту після зараження експериментальних тварин був достовірно знижений як у старих так і у молодих тварин, вочевидь за рахунок споживання гуморального фактора Ig A. Інтенсивність утворення ЦІК була достовірно збільшена протягом усього експерименту у тварин двох вікових категорій. Після дії *P. aeruginosa* і *E. coli* виявили невеликі відмінності в кількісних характеристиках і динаміці зміни показників ЦІК з 3-ої по 7-у добу бактеріальної контамінації між двома віковими групами тварин.

5. В ході експерименту у молодих тварин виявили високу імунореактивність, а у старих тварин більш високу імунорезистентність при індукції запальної реакції антигенами *P. aeruginosa* і *E. coli*. Старі тварини не поступалися молодим за рівнем імунорезистентності, тому що використовували іншу стратегію імунної відповіді.

6. У контрольних молодих тварин після введення як П. так і М. виявили більш високу реактивність в клітинній (фагоцитарна активність) і гуморальній (С3 фрагмент комплементу, ЦІК) ланці імунітету порівняно зі старшою віковою групою контрольних тварин.

7. Превентивне введення імунокоректора П. до індукції запального процесу *E. coli* призвело до пригнічення окисного потенціалу ферментів фагоцитуючих клітин у експериментальних тварин різного віку, за рахунок його антиоксидантної активності, що є негативним для забезпечення фагоцитозу нейтрофілів за допомогою активних форм кисню, який забезпечує ендоцитоз бактеріальних антигенів.

8. Після введення *E. coli* і застосування експериментального композитного препарату М. на різних стадіях запального процесу (до і після введення інфекційного антигену) у старих тварин виявили виражену стимуляцію

функціональної активності фагоцитів, про що свідчать високі показники індексу завершеності фагоцитозу і посилення утворення активних форм кисню (АФК), що сприяють процесингу антигенів. У 22 місячних експериментальних тварин препарат М. стимулював утворення комплексу антиген-антитіло комплемент із подальшою елімінацією цього комплексу протягом експерименту (3-7 доба).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Авдеева М. В. Специфика верификации факторов риска и организационные аспекты первичной профилактики с учетом возрастного фактора // Успехи геронтол. 2013. Т. 26, № 3. С. 481–486.
2. Акимова В. Н. Особенности гуморального иммунитета при острых воспалительных процессах брюшной полости [Электронный ресурс] // Universum: химия и биология. 2015. № 7 (15) URL: <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/2340> (дата обращения 15.01.2017).
3. Алиев Т. Р., Алиев С. Д., Аллахвердиева Л. И. Изменения концентрации циркулирующих иммунных комплексов, активности комплемента и уровней Ig E и Ig G в крови и лимфе при экспериментальном анафилактическом шоке и феномене Артюса // Иммунология. 2015. № 2. С. 107–110.
4. Анисимов В. Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. Санкт-Петербург: Наука, 2003. 468 с.
5. Бажанова Е. Д. Апоптоз нейросекреторных клеток гипоталамуса при стрессе и старении: роль иммуномодуляторов // Рос. физиологический журнал. 2012. № 4. С. 542–550.
6. Белоцкий С. М., Спивак Н. Я. Очерки о фагоцитозе. Киев: Фитосоциоцентр, 2009. 304 с.
7. Бережная Н. М. Цитокины и воспаление // Иммунология. 2007. Т. 6, № 2. С. 26–34.
8. Бережная Н. М., Сепиашвили Р. И. Семейство интерлейкинов 17 // Аллергология и иммунология. 2015. № 1, Т. 16. С. 154–164.
9. Беспалова И. Д., Рязанцев Н. В., Калюжин В. В. Системное воспаление в патогенезе метаболического синдрома и ассоциированных с ним заболеваний // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2013. № 2. С. 5–9.
10. Бісюк Ю. А. Специфічний імунитет до ендотоксину у хворих з загостренням бронхіальної астми // Світ медицини та біології. 2015. № 4(54). С. 8–11.

11. Блинов Л. Н., Перфилова И. Л. Микробиология и иммунология: Учебное пособие. Санк-Петербург: Лань, 2013. 240 с.
12. Богданова Н. М., Булатова Е. М., Васиа М. Н. Современный взгляд на микробиоценоз, иммунный ответ и факторы, влияющие на их формирование. Фундаментальные и прикладные аспекты // Вопросы современной педиатрии. 2013. № 12(4). С. 18–25.
13. Бодров В. А. Психологический стресс. Развитие и преодоление : учеб. пособие. Москва, 2012. 528 с.
14. Божков А. И. Низкокалорийная диета как модель увеличения продолжительности жизни и исследования механизмов старения // Успехи геронтологии. 2001. № 8. С. 88–99.
15. Божков А. И. Эпигенетические механизмы старения // Проблема старения и долголетия. 2005. № 14. С. 9–13.
16. Божков А. И. Эпигенотип, принципы современной организации метаболизма и старения // Проблемы старения и долголетия. 2010. Т. 19, № 3. С. 223–224.
17. Божков А. И., Длубовская В. Л., Малеев В. А., Дмитриев Ю. В., Белецкая Л. Б. Сдерживающая рост диета вызывает различные стратегии адаптации организма молодых и взрослых животных // Успехи геронтологии. 2006. № 19. С. 36–43.
18. Божков А. И., Климова Е. М., Дмитриев Ю. В., Длубовская В. Л. Реакция иммунной системы крыс разного возраста на сдерживающие рост диеты // Проблема старения и долголетия. 2006. Т. 15, № 2. С. 93–103.
19. Божков А. И., Сидоров В. И., Кургузова Н. И., Дубловская В. Л. Метаболическая память усиливает эффект гормезиса к ионам меди и имеет возрастзависимый характер // Успехи геронтологии. 2014. Т. 27, № 13. С. 72–80.
20. Виксман М. Е., Маянский А. Н. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросиневого тетразолия: Метод. Рекомендации. Казань: Казанский НИИЭМ, 1979. 11 с.

21. Викторов А. А., Холоднов В. А. Кинетическая теория старения живых систем // Успехи геронтологии. 2013. Т. 26, № 1. С. 58–65.
22. Возможная роль «метаболической памяти» в формировании ответной реакции на стресс – факторы у молодых и взрослых организмов / А. И. Божков и др. // Успехи геронтологии. 2009. Т. 22, № 2. С. 259–268.
23. Воробьева Н. В. Молекулярные механизмы фагоцитоза // Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9(18), № 2 С. 5–13.
24. Врачебные ассоциации, медицинская этика и общемедицинские проблемы. Сборник официальных документов / под. ред. В. Н. Уранова. Москва: ПАИМС, 1995. 7 с.
25. Габидуллин Ю. З., Суфияров Р. С., Туйгунов М. М. Влияние штаммов бактерий *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *E. coli*, *Proteus* spp. и их сокультивируемых вариаций на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов мышей // Медицинский вестник Башкортостана. 2015. Т. 10, № 6(60). С. 58–62.
26. Гариб Ф. Ю., Ризопулу А. П. Взаимодействия патогенных бактерий с врожденными иммунными реакциями хозяина // Инфекция и иммунитет. 2012. Т. 2, № 3. С. 581–596.
27. Гильмиярова Ф. Н., Радомская В. М., Гусякова О. А. Характеристика иммунного статуса больных аллергическими заболеваниями дыхательных путей // Клиническая лабораторная диагностика. 2010. № 1. С. 43–46.
28. Грачев С. В., Прохоренко И. Р., Зубова С. В. Участие Toll-подобного рецептора 4 в интернализации бактерий *Escherichia coli* нейтрофилами крови человека в присутствии липополисахаридов // Медицинская иммунология. 2012. Т. 14, № 3. С. 219–222.
29. Гриневич Ю. А., Алферов А. Н. Определение иммунных комплексов // Лабораторное дело. 1981. № 8. 493 с.
30. Гюлазан Н. М., Белая О. Ф., Малов В. А. Липополисахариды/эндотоксины грамотрицательных бактерий: роль в развитии интоксикации // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2014. № 2. С. 11–16.

31. Дранник Г. Н. Клиническая иммунология и аллергология: учеб. пособие для студентов, врачей-интернов, иммунологов, аллергологов, врачей лечебного профиля всех специальностей. Киев: «Полиграф плюс», 2010. 552 с.
32. Ездакова И. Ю., Лощинин М. Н., Ефремова М. С. Корреляции параметров иммунного ответа у мышей при подкожном и пероральном методах иммунизации // Аллергология и иммунология. 2014. Т. 15, № 3. С. 225–226.
33. Железнякова Н. М. Функциональная активность фагоцитов и система комплемента у больных с хроническим обструктивным заболеванием легких и хроническим панкреатитом // Мир медицины и биологии. 2012. № 1. С. 62–64.
34. Зигангирова Н. А., Нестеренко Л. Н., Тиганова И. Г., Кост Е. А. Регуляторная роль системы секреции III типа грамотрицательных бактерий в развитии хронического инфекционного процесса // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2012. № 3. С. 3–13.
35. Зубова С. В., Волошина Е. В., Косякова Н. И., Грачёв С. В., Прохоренко И. Р. Активация мононуклеаров крови человека липополисахаридами разного состава // Медицинская иммунология. 2010. Т. 12, № 4-5. С. 405–408.
36. Ивашина И. Б. Большой практикум «Микробиология». Москва: Проспект науки, 2014. 112 с.
37. Ильяшенко М. Г., Тарасова Г. Н., Федотова Е. Н., Чумакова Е. А. Фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов у больных с воспалительными заболеваниями кишечника в зависимости от клинических характеристик заболевания // Практическая медицина. 2012. № 7(62). С. 170–173.
38. Инновационные методы исследования возрастной патологии / В. В. Башук и др. // Фундаментальные исследования. 2012. № 1. С. 14–17.
39. Камышева К. С. Микробиология, основы эпидемиологии и методы микробиологических исследований. Ростов: Феникс, 2014. 346 с.
40. Климова Е. М., Коваленко Т. И., Минухин В. В., Агаркова А. Н. Оценка факторов первичной иммунорезистентности на экспериментальной модели инфекционного процесса у животных разного // «Імунологія та Алергологія. Наука і практика». 2014. № 3. С. 94–99.

41. Коваленко Т. И. Формирование гуморального ответа после действия антигенов *P. aeruginosa* и *E. coli* у экспериментальных животных разного возраста // Экспериментальна і клінічна медицина. 2015. № 1(66). С. 24–27.
42. Коваленко Т. И., Климова Е. М. Возрастные изменения клеточного и гуморального звена иммунорезистентности у экспериментальных животных разного возраста при воспалении // Медичний форум. 2016. № 7(07). С. 85–88.
43. Коваленко Т. И., Климова Е. М. Возрастные особенности иммунного ответа у экспериментальных животных после действия инфекционных антигенов // Медична наука і сучасність – 2015: матеріали міжнародної науково-практичної конференції, 24 квітня 2015 р. Київ, 2015. С. 69–72.
44. Коваленко Т. И., Климова Е. М. Интенсивность образования циркулирующих иммунных комплексов у экспериментальных животных разного возраста с моделью воспаления и после действия композитного пептидного препарата // Пріоритети сучасної медицини: теорія і практика: матеріали міжнародної науково-практичної конференції, 6–7 лютого 2015 р. Одеса, 2015. С. 195–196.
45. Коваленко Т. И., Климова Е. М. Оценка врожденного клеточного фактора иммунного ответа у крыс разного возраста при экспериментальном инфекционном процессе и применении иммунокоректора // Нове та традиційне у дослідженнях сучасних представників медичної науки: збірник матеріалів міжнародної науково-практ. конф, 26–27 лютого 2016 р. Львів, 2016. С. 93–95.
46. Коваленко Т. И., Климова Е. М., Минухин В. В. Концентрация циркулирующих иммунных комплексов при экспериментальном генерализованном процессе у животных разного возраста под действием иммуномодуляторов [Электронный ресурс] // Анналі Мечниковського інституту. 2015. № 2. С. 220–223 URL: www.imiamn.org.ua/journal/2_2015/PDF/42 (дата обращения: 10.11.2015).
47. Коваленко Т. И., Климова Е. М., Минухин В. В., Агаркова А. Н. Оценка клеточных и гуморальных факторов иммунорезистентности на

экспериментальной модели воспалительного процесса у животных разного возраста // Лабораторна діагностика. 2014. № 4(70). С. 36–41.

48. Коваленко Т. И., Климова Е. М., Минухин В. В., Кузьменко А. Н. Влияние Полиоксидония на содержание компонента С3 комплемента у крыс разного возраста при генерализованном процессе // Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe (East European Scientific Journal). 2015. № 2. С. 121–124.

49. Коваленко Т. И., Климова Е. М., Минухин В. В., Кузьменко А. Н. Оценка активности фагоцитоза у животных разного возраста при генерализованном воспалительном процессе на фоне применения иммунного препарата // Cambridge Journal of Education and Science, «Cambridge University Press». 2016. № 1(15). С. 178–184.

50. Коваленко Т. И., Климова Е. М., Панич Р. В. Формирование первичной иммунорезистентности у животных разного возраста на экспериментальной модели воспалительного процесса // Актуальні питання боротьби з інфекційними захворюваннями: тези доповідей міжнародної науково-практичної конференції, 14–15 травня 2015 р. Харків, 2015. С. 23.

51. Коваленко Т. И., Минухин В. В., Климова Е. М. Влияние комбинированного препарата на ферментативную активность нейтрофилов у крыс разного возраста при генерализованном воспалительном процессе // Вісник проблем біології і медицини. 2015. Т. 4(121), № 2. С. 129–131.

52. Коваленко Т. И., Минухин В. В., Климова Е. М. Иммунорезистентность экспериментальных животных разного возраста на модели генерализованного воспалительного процесса // Світ медицини та біології. 2015. № 3(52). С. 106–109.

53. Коваленко Т. И., Минухин В. В., Климова Е. М., Быченко А. А., Мушли А. Б. Изучение ферментативной активности гранулоцитарных нейтрофилов у животных с экспериментальной инфекцией разного возраста // Актуальные вопросы современной медицины: сб. науч. тр. по итогам межвузовской ежегодной заочной научно-практической конференции с международным участием, 11–13 марта 2014 г. Екатеринбург, 2014. С. 86–89.

54. Коваленко Т. І. Вроджена клітинна відповідь у експериментальних тварин різного віку на тлі запалення і введення імунокоректорів // Український біофармацевтичний журнал. 2017. № 5(52). С. 16–20.
55. Коваленко Т. І., Клімова О. М. Оцінка гуморальних факторів первинного та вторинного імунітету після дії антигенів *E. coli* у експериментальних тварин різного віку // Механізми функціонування фізіологічних систем: матеріали міжнародної науково-практичної конференції, 15–17 жовтня 2014 р. Львів, 2014. С. 46–47.
56. Коваленко Т. І., Турута Д. О. Вивчення гуморальної ланки імунної відповіді на експериментальних моделях запального процесу у тварин двох вікових груп після дії антигенів *P. aeruginosa* // Медицина третього тисячоліття: збірник тез міжвузівської конференції молодих вчених та студентів, 20 січня 2015 р. Харків, 2015. С. 28–29.
57. Ковальчук Л. В., Ганковская, Л. В., Мешкова Р. Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 640 с.
58. Ковальчук Л. В., Свитич О. А., Ганковская Л. В., Мирошниченко А. М., Ганковсий В. А. Роль Toll-подобных рецепторов в патогенезе инфекционных заболеваний человека // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2012. № 2. С. 147–153.
59. Комаров Ф. И., Рапорт С. И., Чибисов С. М. Роль проблемной комиссии «Хронобиология и хрономедицина» РАМН в развитии внутренней медицины // Клиническая медицина. 2007. № 9. С. 14–16.
60. Косинец, В. А. Коррекция биоэнергетических процессов в тонкой кишке при экспериментальном распространенном гнойном перитоните // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2012. № 8. С. 39–43.
61. Кудрявицкий А. И. Оценка киллерной бактерицидности нейтрофилов периферической крови здоровых доноров и больных в прямом визуальном тесте // Лабораторное дело. 1985. № 1. С. 45–47.

62. Кузьменко О. В., Никифорова Н. А., Иваненко М. О. Фагоцитарная активность нейтрофилов периферической крови крыс с различной реакцией на стресс // Весник Харьковского национального университета им. В. Н. Каразина. Серия: биология. 2010. № 11. С. 173–177.
63. Кулимбетов М. Т., Рашитов М. М., Саатов Т. С. Процессы адаптации тиреоидного статуса крыс разного возраста в условиях хронического дефицита йода в питании // Международный эндокринологический журнал. 2009. № 2(20). С. 33–37.
64. Кундиев Ю. И. Состояние биоэтики в Украине // Медичний Всесвіт. 2006. Т. 11, № 1-2. С. 41–46.
65. Лавинская Е. В., Климова Е. М. Биоиндикация цитотоксических факторов патологических сывороток человека и животных после иммунизации // Биологический весник. 2009. Т. 13, № 1-2. С. 45–49.
66. Лахтин М. В., Лахтин В. М., Афанасьев С. С. Кофункционирование защитных систем: мукозальный иммунитет и система комплемента человека // Бюллетень ВСИЦ СО РАМН. 2015. № 5(105). С. 11–122.
67. Левинсон У. Медицинская микробиология и иммунология. Москва: Бином, 2015. 1181 с.
68. Лютфалиева Г. Т., Добродеева Л. К. Аутоантитела: физиологическое значение в регуляции гомеостаза // Экология человека. 2007. № 8. С. 38–42.
69. Малежик Л. П., Малежик М. С., Нимаева Д. Ц., Пинелис Ю. И. Динамика компонентов системы комплемента у пожилых людей, страдающих хроническим генерализованным пародонтитом и ишемической болезнью сердца // Дальневосточный медицинский журнал. 2014. № 2. С. 11–12.
70. Маннапова Р. Т. Микробиология и иммунология. Практикум : учебное пособие. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 544 с.
71. Медицинские лабораторные технологии: в 2 Т / ред. А. И. Карпищенко. Санк-петербург: Интермедика, 2002. Т. 1. 408 с.
72. Мечников И. И. Вопросы иммунитета. Избранные труды. СССР: Академия наук, 1951. 735 с.

73. Минько А. А. Статистический анализ в MS Excel. Москва: Вильямс, 2004. С. 382–399.
74. Мурзабаева Р. Т., Дубровская Д. Н. Системный воспалительный ответ при острых кишечных инфекциях, сопровождавшихся выделением условно-патогенных энтеробактерий у взрослых // Медицинский вестник Башкортостана. 2015. Т. 10, № 6(60). С. 5–1
75. Нехорошкова А. Н., Грибанов А. В., Депутат И. С. Сенсомоторные реакции в психофизиологических исследованиях // Вестн. САФУ Серия «Медико-биологические науки». 2015. № 1. С. 38–48.
76. Новосельцев В. Н., Новосельцева Ж. А. Здоровье, гомеостаз и долголетие // Успехи геронтологии. 2012. Т. 2, № 3. С. 187–195.
77. Ноздрачев А. Д., Марьянович А. Т., Поляков Е. Л., Сибаров Д. А., Хавинсон В. Х. Нобелевские премии по физиологии или медицине за 100 лет. Санкт-Петербург: Гуманистика, 2002. 688 с.
78. Опарина О. Н., Белоусова И. Б. Влияние эндотоксина кишечной микрофлоры на снижение иммунитета к инфекциям // Приволжский научный вестник. 2014. № 2(30). С. 170–172.
79. Пащенко М. В., Алхазова Б. И., Львов В. Особенности индукции провоспалительных генов в дендритных клетках и макрофагах под действием глюкозаминилмурамилтрипептида грамотрицательных бактерий // Иммунология. 2013. № 1. С. 10–15.
80. Першин Г. Н. Методы экспериментальной химиотерапии. Москва: Медицина, 1971. 541 с.
81. Петров Р. В. Иммунология. Москва: Медицина, 1982. 386 с.
82. Петров Р. В., Хаитов Р. М. Иммунный ответ и старение // Успехи современной биологии. 1975. Т. 79, №.1. С. 111–127.
83. Потапнев М. П. Аутофагия, апоптоз, некроз клеток и иммунное распознавание своего и чужого // Иммунология. 2014. № 2. С. 95–100.

84. Пустовіт С. В., Кулініченко В. Л., Карагодіна О. Г. Розвиток ідей біоетики у європейському контексті: IV Міжнародного симпозіуму з біоетики. Київ: СФЕРА, 2006. 160 с.
85. Ризопулу А. П., Гариб Ф. Ю., Взаимодействия патогенных бактерий с врожденными иммунными реакциями хозяина / Инфекция и иммунитет. 2012. Т. 2, № 3. С. 581–596.
86. Романова Т. А., Смиян А. И., Василишин К. И., Бында Т. П., Сухарева В. А. Состояние клеточного и гуморального звеньев иммунитета при внебольничной пневмонии, ассоциированной с железодефицитной анемией у детей дошкольного возраста // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2014. Т. 24(195), №. 28. С. 77–81.
87. Савченко А. А., Борисов А. Г., Здзитовецкий Д. Э., Кудрявцев И. В. Состояние клеточного и гуморального иммунитета в зависимости от исхода распространенного гнойного перитонита // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 1. С. 63–70.
88. Савченко А. А., Здзитовецкий Д. Э., Борисов А. Г., Лузан Г. А. Особенности состояния клеточного и гуморального иммунитета и уровни концентрации цитокинов у больных с распространенным гнойным перитонитом // Сибирское медицинское обозрение. 2013. № 1. С. 24–28.
89. Семикина Е. Л., Копыльцова Е. А., Алешкин В. А., Топтыгина А. П. Возрастные особенности формирования гуморального звена иммунного ответа у детей // Медицинская иммунология. 2012. Т. 14, № 3-4. С. 289–294.
90. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / под. ред. С. Н. Лопач, А. В. Чубенко. Киев: МОРИОН, 2000. 320 с.
91. Татарко С. В. Содержание маркерных цитокинов Th1 и Th2-лимфоцитов в периферической крови при остром и хроническом воспалении // Мир медицины и биологии. 2014. № 4(46). С. 153–156.

92. Титова Ж. В., Бодиенкова Г. М. Роль цитокиновой сети в механизмах нейроиммунного взаимодействия (обзор литературы) // Бюллетень ВСИЦ СО РАМН. 2015. № 2(90), Ч. 1. С. 171–175.
93. Фадеев С. Б., Волков Д. В. Интегральная количественная оценка общего состояния животных в экспериментальной хирургии // Вестник ОГУ. 2013. №1. С. 147–150.
94. Федоров Ю. Н., Ездакова И. Ю. Методические рекомендации по количественному определению и оценке функциональной активности иммунокомпетентных клеток животных // Сборник «Новые методы исследований по проблемам ветеринарной медицины». 2008. № 4. С. 144–158.
95. Фролькис В. В., Мурадян Х. К. Старение, эволюция и продление жизни. Киев: Наука Думка, 1992. 336 с.
96. Хаитов Р. М., Пинегин Б. В. Современные представления о защите организма от инфекции // Иммунология. 2000. № 1. С. 61–64.
97. Хаитов Р. М., Пинегин Б. В., Ярилин А. А. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 345 с.
98. Чеботарев Д. Ф., Коркушко О. В., Шатило В. Б. Преждевременное (ускоренное) старение: причины, диагностика, профилактика и лечение // Мед. Всесвіт. 2011. Т. 1, № 1. С. 28–38.
99. Черешнев В. А., Гусев Е. Ю. Иммунологические и патофизиологические механизмы системного воспаления // Медицинская иммунология. 2012. Т. 14, № 1-2. С. 9–20.
100. Черешнева М. В., Черешнев В. А. Иммунологические механизмы локального воспаления // Медицинская иммунология. 2011. Т. 13, № 6. С. 557–568.
101. Чоп'як В. В. Лекції з клінічної імунології для практичних лікарів. Львів : Видавництво ЛНМУ ім. Данила Галицького, 2013. 350 с.
102. Щеголева Л. С., Филиппова О. Е., Сергеева Т. Б., Шашкова Е. Ю., Некрасова М. В. Физиологическая роль клеточно-опосредованной

цитотоксичности в реакциях иммунитета у лиц в экстремальных климатозэкологических условиях // Журнал медико-биологических исследований. 2013. № 1. С. 89–95.

103. Ярилин А. А. Иммунология. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с.

104. Age related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling / O. V. Britanova et. al // J. Immunol. 2014. Vol. 192. P. 2689–2698.

105. Anand R. J., Dai S., Gribar S. C. A role for connexin 43 in macrophage phagocytosis and host survival after bacterial peritoneal infection // J Immunol. 2008. Vol. 181. P. 834–843.

106. Anderluh G., Gilbert R. MACPF/CDC Proteins – Agents of Defence, Attack and Invasion // Subcellular Biochemistry, Springer Science + Business Media Dordrecht, 2014. Vol. 80. 329 p.

107. Bolger M. S., Ross D. S., Jiang H. Complement levels and activity in normal and LPS-injured lung // Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007. Vol. 292(3). P. 748–759.

108. Borghesi L., Milcarek C. From B cell to plasma cell regulation of V(D) J recombination and antibody secretion // Immunol. Research. 2012. Vol. 36(1-3). P. 27–32.

109. Bozhkov A. I., Nikitchenko Yu. V. Caloric Restriction Diet Induces Specific Epigenotypes Associated with Life Span Extension // Journal of Nutritional Therapeutics. 2013. Vol. 2, N 1. P. 30–39.

110. Calin-Jageman R. J., Fischer T. M. Behavioral adaptation of the Aplysia siphon withdrawal response is accompanied by sensory adaptation // Behavioral Neuroscience. 2007. Vol. 121(1). P. 200–211.

111. Carrageenans effect on neutrophils alone and in combination with LPS in vitro / E. V. Sokolova et. al. // J Biomed Mater Res A. 2016. Vol. 104(7). P. 9–1603.

112. CD4+ Natural Killer T Cells Potently Augment Aortic Root Atherosclerosis by Perforin- and Granzyme B- Dependent Cytotoxicity / Y. Li et.al // Circulation Research. 2015. Vol. 116, N 2. P. 245–254.

113. Churpiĭ I. K. Changes of humoral immunity in patients operated for peritonitis // *Klin Khir.* 2014. Vol. 2. P. 5–14.
114. Cohen T. S., Prince A. S. Activation of inflammasome signaling mediates pathology of acute *P. aeruginosa* pneumonia // *The Journal of clinical investigation.* 2013. Vol. 123. P. 1630–1635.
115. Cornelis P., Dingemans J. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections // *Frontiers in cellular and infection mscrobiology.* 2013. Vol. 3. P. 75–79.
116. Dale D. C., Boxer L., Liles W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes // *Blood*, 2008. Vol. 112 (4). P. 935–945.
117. Differential requirements of CD4⁺ T-cell signals for effector cytotoxic T-lymphocyte (CTL) priming and functional memory CTL development at higher CD8⁺ T-cell precursor frequency / C. S. Umeshappa et. al // *Immunology.* 2013. Vol. 138, N 4. P. 298–306.
118. Dubois D., Delmas J., Cady A. Cyclomodulins in urosepsis strains of *Escherichia coli* // *Journal Clin Microbiol.* 2010. N 48(6). P. 2122–2129.
119. Experimental autoimmune encephalomyelitis and age-related correlations of NADPH oxidase, MMP-9, and cell adhesion molecules: The increased disease severity and blood-brain barrier permeability in middle-aged mice / J. E. Seo et. al // *J Neuroimmunol.* 2015. Vol. 287. P. 43–53.
120. Fensterl V., Sen G. C. Interferons and viral infections // *Biofactors.* 2009. Vol. 35(1). P. 14–20.
121. Fialkow L., Wang Y., Downey G. P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function // *Free Radic Biol Med.* 2007. Vol. 42, N 2. P. 153–164.
122. Forsythe P. Microbes taming mast cells: Implications for allergic inflammation and beyond // *Eur J Pharmacol.* 2016. Vol. 778. P. 75–169.
123. Frost E. L., Kersh A. E., Evavold B. D., Lukacher A. E. Cutting edge: resident memory CD8 T cells express high-affinity TCRs // *J. Immunol.* 2015. Vol. 195. P. 3520–3524.

124. Functional exhaustion of CD4⁺ T cells induced by co-stimulatory signals from myeloid leukaemia cells / D. Ozkazanc et. al // Immunology. 2016. Vol. 149(4). P. 460–471.
125. Gems D. Evolution of sexual dimorphic longevity in humans // Aging (Albany NY). 2014. Vol. 6. P. 84–91.
126. Gomez G. G., Kruse C. A. Cellular and functional characterization of immunoresistant human glioma cell clones selected with alloreactive cytotoxic T-lymphocyte reveals their up-regulated synthesis of biologically active TGF-beta // J. Immunotherapy. 2007. Vol. 30(3). P. 261–273.
127. Griffin D. O., Rothstein T. I. Human B1 cell frequency: isolation and analysis of human B1 cells // Front. Immunol. 2012. Vol. 3. P. 122–123.
128. Haynes L., Swain S. L. Aged-related shifts in T cell homeostasis lead to intrinsic T cell defects // Semin. Immunol. 2012. Vol. 24. P. 350–255.
129. Hoffmann J. Innate immunity // Current Opinion in Immunology. 2013. Vol. 25, N 1. P. 1–3.
130. Human CD19 and CD40L deficiencies impair antibody selection and differentially affect somatic hypermutation / M. C. van Zelm et. al // J Allergy Clin Immunol. 2014 Vol. 134(1). P. 44–135.
131. Immune complexes inhibit IL-1 secretion and inflammasome activation / J. R. Janczy et. al // Journal Immunol. 2014. N 193(10). P. 5190–5198.
132. Immunoglobulins Ig G1, Ig M and Ig A: a synergistic team influencing survival in sepsis / J. F. Bermejo-Martín et al // J Intern Med. 2014. Vol. 276(4). P. 12–404.
133. Inducing Humoral Immune Responses Against Regulatory T Cells by Foxp 3-Fc (IgG) Fusion Protein / M. N. Neda et. al // Monoclon Antib Immunodiagn Immunother. 2015. Vol. 34(6). P. 5–381.
134. Induction of langerin⁺ Langerhans cell-like cells expressing reduced TLR3 from CD34⁺ cord blood cells stimulated with GM-CSF, TGF- β 1, and TNF- α / H. Azuma et. al // Biomed Res. 2016. Vol. 37(5). P. 271–281.
135. Interaction of TIM4 and TIM3 induces T helper 1 cell apoptosis / R. T. Ge et. al // Immunol Res. 2016. Vol. 64(2). P. 5–470.

136. Interplay between fibrinolysis and complement: plasmin cleavage of i C3b modulates immune responses / J. H. Foley et. al // J Thromb Haemost 2015. Vol. 13(4). P. 8–610.
137. Involvement of main diarrheagenic *Escherichia coli*, with emphasis on enteroaggregative *E. coli*, in severe non-epidemic pediatric diarrhea in a high-income country / J. Tobias et. al // BMC infection diseases. 2015. Vol. 15. P. 79–84.
138. Ishii H., Yoshida M. Inflammatory cytokines // Nippon Rinsho. 2010. Vol. 68, N 5. P. 819–822.
139. Kadhum H. J., Finlay D., Rowe M. T. Occurrence and characteristics of cytotoxic necrotizing factors, cytolethal distending toxins and other virulence factors in *Escherichia coli* from human blood and fecal samples // Epidemiology And Infection. 2008. Vol. 103(6). P. 752–760.
140. Kennedy A. D., Deleo F. R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection // Immunol Res. 2009. Vol. 43, N 1-3. P. 25–61.
141. Kennedy A. D., Deleo F. R. PI3K and NADPH oxidase: a class act. // Blood. 2008. Vol. 12, N 13. P. 4788–4789.
142. Kerina J. D., Trent M. W., Stephen M. T., Leonie K. Callaway Complement in Pregnancy: A delicate Balance // American Journal of Reproductive Immunology. 2013. Vol. 69. P. 3–11.
143. Kolb G. F., Weißbach L. Demographic change: Changes in society and medicine and developmental trends in geriatrics // Urologe A. 2015. Vol. 54(12). P. 9–1701.
144. Kovalenko T. I., Panich R. V. The change in the concentration of C3 fragment of complement in inflammation and use of the immunocorrection drug in experimental animals of different ages // For medical students and young scientists: 8th International Scientific Interdisciplinary Conference, 14–15 may 2015. Kharkiv, 2015. P. 233–234.
145. Kozak D. V. Dynamics of circulating immune complexes and immunoglobulins in response to polytrauma in experiment // Klin Khir. 2013. Vol. 12. P. 8–76.
146. Kremlitzka M., Mácsik-Valent B., Erdei A. Regulation of B cell functions by Toll-like receptors and complement // Immunol Lett. 2016. N 178. P. 37–44.

147. Lambrecht B. N., Hammad H. The immunology of asthma // *Nature immunology*. 2015. Vol. 16, N 1. P. 45–56.
148. Luo H. R., Loison F. Constitutive neutrophil apoptosis mechanisms and regulation // *Am J Hematol*. 2008. Vol. 8(4). P. 288–295.
149. Maecker H., Mc Coy P., Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the human immunology project // *Nat. Rev. Immunol*. 2012. Vol. 12. P. 191–200.
150. Mapping interactions between complement C3 and regulators using mutations in atypical hemolytic uremic syndrome / E. C. Schramm et. al // *Blood*. 2015. Vol. 125. P. 2359–2369.
151. Mariathason S., Monack D. M. Inflammasome adaptors and sensors intracellular regulators of infection and inflammation // *J. Nat. Rev. Immunol*. 2007. N 7. P. 31–40.
152. McCormack R., de Armas L., Shiratsuchi M., Podack E. R. Killing machines: three pore-forming proteins of the immune system // *Immunologic Research*. 2013. Vol. 57. P. 268–278.
153. Merle N. S., Church S. E., Fremeaux-Bacchi V., Roumenita L. T. Complement system part I-molecular mechanisms of activation and regulation // *Frontiers in immunology*. 2015. Vol. 6. P. 262–266.
154. Moazzam S., Hussain M. M., Ahmad T. A. Effect of chronic restraint stress on immune status of male Sprague Dawley rats // *J Coll Physicians Surg Pak*. 2013. Vol. 23(7). P. 90–487.
155. Murphy K., Travers P., Walport M., Janeway C. *Janeway's Immunobiology*. 8th edition. NewYork : Garland Science, 2012. 888 p.
156. Naneh O., Avcin T., Zavec A. B. Perforin and Human Diseases // *Subcellular biochemistry*. 2014. Vol. 80. P. 221–239.
157. Nilsson B., Nilsson EK. Complement Diagnostics: Concepts, Indications, and Practical Guidelines // *Clinical and Developmental Immunology*. 2012. Article ID 962702. – 11 p.
158. Ocaria M. G. Autoregulation mechanism of human neutrophil apoptosis during bacteriae infection // *Mol. Immunol*. 2008. Vol. 45(7). P. 2087–2096.

159. Oqawa K., Funaba M. Activin in humoral immune responses // *Vitam Horm.* 2011. Vol. 85. P. 235–253.
160. Pavlova T. V., Prashchaeu K. L. Correcting programmes of biological age for people with chronic somatic pathology // *Problemy stareniya i dolgoletiya.* 2012. Vol. 21, N 3. P. 316–327.
161. Pengo N., Cenci S. The role of autophagy in plasma cell ontogenesis // *Autophagy.* 2013. Vol. 9(6). P. 4–942.
162. Pereira B. I, Akbar A. N. Convergence of Innate and Adaptive Immunity during Human Aging // *Front Immunol.* 2016. N 4. 445 p.
163. Prost L. R., Sanowar S., Miller S. I. Salmonella sensing of antimicrobial mechanisms to promote survival within macrophages // *Immunol. Rev.* 2007. Vol. 219. P. 55–65.
164. Ramanathan S., Dubois S., Gagnon J., Mariathasan S. Regulation of cytokine-driven functional differentiation of CD8 T cells by suppressor of cytokine signaling 1 controls autoimmunity and preserves their proliferative capacity toward foreign antigens // *Journal Immunol.* 2010. N 181(1). P. 357–366.
165. Regulated IRE1-dependent decay participates in curtailing immunoglobulin secretion from plasma cells / S. Benhamron et. al // *Eur J Immunol.* 2014. Vol. 44(3). P. 76–867.
166. Ricklin D., Lambris J. D. Complement in Immune and Inflammatory Disorders: Therapeutic Interventions // *The Journal of Immunology.* 2013. Vol. 190, N 89. P. 3839–3847.
167. Riger C. J., Fernandes P. N., Vilela L. F. Evaluation of heavy metal toxicity in eukaryotes using a simple functional assay // *Metallomics.* 2011. Vol. 3(12). P.1355–1361.
168. Role of Toll-like receptor 2 and 4 signaling pathways on the inflammatory response to resistance training in elderly subjects / P. Rodriguez-Miguel et. al // *Age (Dordr).* 2014. Vol. 36(6). P. 34–97.
169. Salomao P. Bacterial sensing, cell signaling and modulation of the immune response during sepsis // *Shock.* 2012. Vol. 38(3). P. 227–242.

170. Samuel R., Karkada S., Fernandes S., Bhat P. Materno foetal physiological parameters in sitting and left lateral position during non-stress test (NST) monitoring in pregnancy: a cross over study // *Pulse*. 2015. Vol. 92. P. 12–294.
171. Schenkel J. M., Masopust D. Tissue-resident memory T cells // *Immunity*. 2014. Vol. 41. P. 885–897.
172. Schymeinsky J., Mocsai A., Walzog B. Neutrophil activation via beta2 integrins (CD11/CD18): molecular mechanisms and clinical implications // *Thromb Haemost.* 2007. Vol. 98, N 2. P. 262–273.
173. Selective induction of CTL ‘helper’ rather than killer activity by natural epitope variants promotes DC-mediated HIV-1 dissemination / R. B. Mailliard et. al // *The Journal of Immunology*. 2013. Vol. 191, N 5. P. 2570–2580.
174. Sereti, A., Rodger A. J., French M. A. Biomarkers in Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome: Signals from Pathogenesis // *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2010. Vol. 5, N 6. P. 504–510.
175. Sirisingha S. Insight into the mechanisms regulating immune homeostasis in health and disease // *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 2011. Vol. 29. P. 1–14.
176. Sompayrac L. M. How the immune system work (blackwell's how it works). Melden, MA: Willey-Blackwell, 2008. 144 p.
177. Takahashi R., Ishigami A., Kobayashi Y., Nagata K. Skewing of peritoneal resident macrophages toward M1-like is involved in enhancement of inflammatory responses induced by secondary necrotic neutrophils in aged mice // *Cell Immunol.* 2016. Vol. 305. P. 8–44.
178. Tedder, T. F. Innate and adaptive receptors interact to balance humoral immunity // *J. Immunol.* 2010. Vol. 184. P. 2231–2232.
179. The anti-inflammatory effect of TR6 on LPS-induced mastitis in mice / X. Hu et. al // *Int Immunopharmacol.* 2016. Vol. 30. P. 6–150.
180. The key roles of complement and tissue factor in *Escherichia coli*-induced coagulation in human whole blood / A. Landsem et. al // *Clin Exp Immunol.* 2015. Vol. 182(1). P. 9–81.

181. Thomas R. C., Ruth E. R., Kastenbaum R. Who “Owns” Gerontology? The Importance of Thinking Beyond the Sciences. A Guide to Humanistic Studies in Aging: What Does It Mean to Grow Old? // The Johns Hopkins University. 2014. Vol. 54, N 4. P. 1–5.
182. Time-course analysis of C3a and C5a quantifies the coupling between the upper and terminal Complement pathways in vitro / H. O. Morad et. al // J Immunol Methods. 2015. Vol. 427. P. 8–13.
183. Treatment with low doses of polyclonal immunoglobulin improves B cell function during immune reconstitution in a murine model / A. B. Afonso et. al // J Clin Immunol. 2013. Vol. 33(2). P. 19–407.
184. Vinay D. S., Kwon B. S. CD11c + CD8 + T cells: two-faced adaptive immune regulators // Cell. Immunol. 2010. Vol. 264(1). P. 18–22.
185. Yoshimura A., Muto G. TGF- β function in immune suppression // T. Curr. Top Microbiol. Immunol. 2011. Vol. 350. P. 127–147.
186. Zhou J., Tai G., Liu Y. Activin A down-regulates the phagocytosis of lipopolysaccharide – activated mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo // Cell Immunol. 2008. N 44. P. 69–75.

ДОДАТОК 1

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті, які входять до переліку фахових видань України

1. Коваленко Т. І. Вроджена клітинна відповідь у експериментальних тварин різного віку на тлі запалення і введення імунокоректорів // Український біофармацевтичний журнал. 2017. № 5(52). С. 16–20.

2. Коваленко Т. И., Минухин В. В., Климова Е. М. Влияние композитного препарата на ферментативную активность нейтрофилов у крыс разного возраста при генерализованном воспалительном процессе // Вісник проблем біології і медицини. 2015. № 2, Т. 4 (121). С. 129–131. *"Особистий внесок здобувача: проведено основний обсяг пошукової роботи, отримано результати дослідження ферментативної активності нейтрофілів периферичної крові, підготовлено матеріали до друку"*.

3. Климова Е. М., Коваленко Т. И., Минухин В. В., Агаркова А. Н. Оценка факторов первичной иммунорезистентности на экспериментальной модели инфекционного процесса у животных разного возраста // Імунологія та Алергологія. Наука і практика. 2014. № 3. С. 94–99. (Фахове згідно з наказом від 01.07.2010 р. № 1-05/5). *"Особистий внесок здобувача: отримано результати дослідження фагоцитарної активності нейтрофілів периферичної крові, підготовлено матеріали статті до друку"*.

Статті, що входять до міжнародних наукометричних баз

4. Коваленко Т. И., Минухин В. В., Климова Е. М. Иммунорезистентность экспериментальных животных разного возраста на модели генерализованного воспалительного процесса // Світ медицини та біології. 2015. № 3 (52). С. 106–109. (Russian Science Citation Index, Index Copernicus, Google Scholar, "Cyberleninka").

"Особистий внесок здобувача: проведено основний обсяг пошукової роботи, виконано статистичну обробку отриманих матеріалів та підготовлено матеріали до друку".

5. Коваленко Т. И., Минухин В. В., Климова Е. М., Быченко А. А., Мушли Али. Изучение ферментативной активности гранулоцитарных нейтрофилов у животных с экспериментальной инфекцией разного возраста // Актуальные вопросы современной медицины. Сб. науч. тр. по итогам межвузовской ежегодной заочной научно-практической конференции с международным участием. 2014. С. 86–89. (РИНЦ). *"Особистий внесок здобувача: проведено основний обсяг пошукової роботи, отримано результати дослідження ферментативної активності нейтрофілів периферичної крові, підготовлено матеріали статті до друку".*

Електронне видання

6. Коваленко Т. И., Климова Е. М., Минухин В. В. Концентрация циркулирующих иммунных комплексов при экспериментальном генерализованном процессе у животных разного возраста под действием иммуномодуляторов // Анналы Мечниковського інституту. 2015. № 2. С. 220–223. URL: www.imiamn.org.ua/journal/2_2015/PDF/42. (дата обращения: 10.11.2015). (Index Copernicus, Global Impact Factor). *"Особистий внесок здобувача: проведено основний обсяг пошукової роботи, підготовлено матеріали до написання статті".*

Статті у зарубіжних спеціалізованих виданнях

7. Коваленко Татьяна Игоревна. Климова Елена Михайловна, Минухин Валерий Владимирович, Кузьменко Андрей Николаевич. Оценка активности фагоцитоза у животных разного возраста при генерализованном воспалительном процессе на фоне применения иммунного препарата // Cambridge Journal of Education and Science, «Cambridge University Press». Great Britain, 2016. № 1 (15).

Р. 178–184. *"Особистий внесок здобувача: проведено основний обсяг пошукової роботи, отримано результати дослідження фагоцитарної активності нейтрофілів периферичної крові, підготовлено матеріали до друку"*.

8. Коваленко Татьяна Игоревна, Климова Елена Михайловна, Минухин Валерий Владимирович, Кузьменко Андрей Николаевич. Влияние Полиоксидония на содержание компонента С3 комплемента у крыс разного возраста при генерализованном процессе // Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe (East European Scientific Journal). 2015. № 2. С. 121–124. (РИНЦ). *"Особистий внесок здобувача: проведено основний обсяг пошукової роботи, виконано статистичну обробку отриманих матеріалів підготовлено матеріали статті до друку"*.

Тези науково-практичних конференцій різного рівня

9. Коваленко Т. И., Климова Е. М. Оценка врожденного клеточного фактора иммунного ответа у крыс разного возраста при экспериментальном инфекционном процессе и применении иммунокоректора // Нове та традиційне у дослідженнях сучасних представників медичної науки: збірник матеріалів міжнародної науково-практ. конф., 26–27 лютого 2016 р. Львів, 2016. С. 93–95.

10. Коваленко Т. І., Турута Д. О. Вивчення гуморальної ланки імунної відповіді на експериментальних моделях запального процесу у тварин двох вікових груп після дії антигенів *P. aeruginosa* // Медицина третього тисячоліття: збірник тез міжвузівської конференції молодих вчених та студентів ХНМУ, 20 січня 2015 р. Харків, 2015. С. 28–29. *"Особистий внесок здобувача: отримано результати дослідження сироватки крові імуноглобулінів та фрагменту С3 комплементу, підготовлено матеріали до друку"*.

11. Коваленко Т. И., Климова Е. М. Интенсивность образования циркулирующих иммунных комплексов у экспериментальных животных разного возраста с моделью воспаления и после действия комбинированного пептидного препарата // Пріоритети сучасної медицини: теорія і практика: матеріали

міжнародної науково-практичної конференції, 6–7 лютого 2015 р. Одеса, 2015. С. 195–196.

12. Коваленко Т. И., Климова Е. М. Возрастные особенности иммунного ответа у экспериментальных животных после действия инфекционных антигенов // Медична наука і сучасність – 2015: матеріали міжнародної науково-практичної конференції, 24–25 квітня 2015 р. Київ, 2015. С. 69–72.

13. Kovalenko T. I., Panich R. V. The change in the concentration of C3 fragment of complement in inflammation and use of the immunocorrection drug in experimental animals of different ages // For medical students and young scientists: 8th International Scientific Interdisciplinary Conference, 14th–15th may 2015. Kharkiv, 2015. P. 233–234. *"Особистий внесок здобувача: зроблено основний обсяг пошукової роботи, підготовлено матеріали до друку"*.

14. Коваленко Т. И., Климова Е. М., Панич Р. В. Формирование первичной иммунорезистентности у животных разного возраста на экспериментальной модели воспалительного процесса // Актуальні питання боротьби з інфекційними захворюваннями: тези доповідей міжнародної науково-практичної конференції, 14–15 травня 2015. Харків, 2015. С. 23. *"Особистий внесок здобувача: зроблено аналіз отриманих результатів, підготовлено матеріали до написання тез"*.

15. Коваленко Т. И., Клімова О. М. Оцінка гуморальних факторів первинного та вторинного імунітету після дії антигенів *E. coli* у експериментальних тварин різного віку // Механізми функціонування фізіологічних систем: матеріали міжнародної науково-практичної конференції, 15–17 жовтня 2014. Львів, 2014. С. 46–47.

Сатті, які додатково відображають наукові результати дисертації

16. Коваленко Т. И., Климова Е. М. Возрастные изменения клеточного и гуморального звена иммунорезистентности у экспериментальных животных разного возраста при воспалении // Медичний форум. 2016. № 7 (07). С. 85–88.

17. Коваленко Т. И. Формирование гуморального ответа после действия антигенов *P. aeruginosa* и *E. coli* у экспериментальных животных разного возраста // Экспериментальна і клінічна медицина. 2015. № 1(66). С. 24–27.

18. Коваленко Т. И., Климова Е. М., Минухин В. В., Агаркова А. Н. Оценка клеточных и гуморальных факторов иммунорезистентности на экспериментальной модели воспалительного процесса у животных разного возраста // Лабораторна діагностика. 2014. № 4(70). С. 36–41. *"Особистий внесок здобувача: виконано основний обсяг пошукової роботи, підготовлено матеріали статті до друку"*.

Апробація результатів дисертації

1. Міжнародна наукова конференція «Механізми функціонування фізіологічних систем». Львів, 15–16 жовтня 2014. Заочна форма участі.

2. Міжнародна науково-практична конференція «Пріоритети сучасної медицини: теорія і практика». Одеса, 6–7 лютого 2015. Заочна форма участі.

3. Міжнародна науково-практична конференція «Актуальні питання боротьби з інфекційними захворюваннями», присвячена 170-й річниці з дня народження І. І. Мечникова. Харків, 14–15 травня 2015. Заочна форма участі.

4. Міжвузівська конференція молодих вчених та студентів «Медицина третього тисячоліття». Харків, 20 січня. Доповідь на конференції.

5. 8th International Scientific Interdisciplinary Conference for medical students and young scientists. Kharkiv, 14th –15th May 2015. Доповідь на конференції.

6. Міжнародна науково-практична конференція з медицини «Медична наука і сучасність». Київ, 24 квітня 2015. Заочна форма участі.

7. Міжнародна науково-практична конференція «Нове і традиційне в дослідженнях сучасних представників медичної науки». Львів, 26–27 лютого 2016. Заочна форма участі.

ДОДАТОК 2

ЗАТВЕРДЖУЮ



Проректор з наукової роботи
Харківського національного
медичного університету
проф. В.В. М'ясоєдов
«19» серпня 20 17 р.

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції (метод профілактики, діагностики, лікування, пристрій, форма організаційної роботи та ін.): зміна імунологічного стану організму різної вікової категорії на тлі запалення, викликаного грамнегативними збудниками та спосіб імунокорекції цих станів.
2. Ким і коли запропонований: асистентом кафедри мікробіології, вірусології та імунології ім. Д. П. Гриньова Коваленко Тетяною Ігорівною.
3. Джерело інформації (методичні рекомендації, інформаційний лист, звіт про НДР, дисертація, монографія, з'їзди, конференції, семінари та ін.): дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин за темою «Вікові особливості зміни показників клітинного та гуморального імунітету після дії інфекційних антигенів в експерименті».
4. Де і коли впроваджено: результати дослідження впроваджено у навчальний та науковий процес кафедри мікробіології, вірусології та імунології ім. Д. П. Гриньова ХНМУ.
5. Результати застосування методу за період з 01 вересня 2016 по 30 червня 2017 рр. Покращення уявлення імунологічного резерву організму в процесі онтогенезу після отриманих досліджень.
6. Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п.3): покращення підготовки студентів та удосконалення навчально-наукової бази співробітників кафедри мікробіології, вірусології та імунології ім. Д. П. Гриньова.
7. Зауваження, пропозиції немає.

Відповідальний за впровадження: в. о. завідувача кафедри мікробіології, вірусології та імунології ім. Д. П. Гриньова
д. мед. н., проф. Мішіна М. М.

28.08.2017 р.
(дата)


(підпис)