

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель магистерской
программы

_____ Е.И. Шишацкая

«__» _____ 2020 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Механизмы и последствия активации гипоталамо-гипофизарной системы в
условиях патологии

тема

06.04.01 – Биология

Код и наименование направления

06.04.01.05 – Реконструктивная биоинженерия

код и наименование магистерской программы

Научный руководитель _____ доцент, к.б.н. Ф.А. Гершкорон

подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Выпускник _____ А. В. Попкова

подпись, дата инициалы, фамилия

Рецензент _____ доцент, к.м.н. Т.В. Толмачева

подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Красноярск

2020

Реферат

Магистерская диссертация по теме «Механизмы и последствия активации гипоталамо-гипофизарной системы в условиях патологии» содержит 52 страницы текстового документа, 54 использованных источника, 2 таблицы, 13 рисунков.

ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНАЯ СИСТЕМА, ГОРМОНЫ, КОРТИЗОЛ, ЦИТОКИНЫ, ИНТЕРЛЕЙКИН-1 БЕТА, ИНТЕРЛЕЙКИН-6, ЭРИТРОЦИТЫ, ЛИМФОЦИТЫ, ДИФФУЗНО-ТОКСИЧЕСКИЙ ЗОБ.

Цель диссертации – исследовать механизмы и последствия активации гипоталамо-гипофизарной системы в условиях патологии «Диффузно-токсический зоб».

В качестве объектов исследования использовались цельная кровь, сыворотка крови здоровых людей и больных людей с ДТЗ.

Исследовано содержание гормона кортизола в сыворотке крови больных ДТЗ.

Проведена оценка содержания цитокинов: интерлейкина-1 бета и интерлейкина-6 в сыворотке крови при ДТЗ.

Исследованы кислотная резистентность, возрастной состав и содержание эритроцитов крови у больных ДТЗ.

Проведена оценка морфологического состава лейкоцитов крови при ДТЗ.

Построена схема взаимосвязи исследуемых показателей при патологии «Диффузно-токсический зоб».

Аннотация

Диффузный токсический зоб (ДТЗ) – аутоиммунное заболевание, вызванное значительной секрецией тиреоидных гормонов диффузной тканью щитовидной железы, которое приводит к тиреотоксикозу (отравление гормонами). По сводным статистическим данным ДТЗ встречается у 0,03% мужчин и 0,19% женщин. Наиболее частый возраст заболевания 20-50 лет. Распространенность ДТЗ в среднем по России 0,1-0,2%. Частота новых случаев ДТЗ: 3 на 1000 женщин в год.

В организме человека существуют две основные нейроэндокринные регуляторные системы симпато-адреналовая и гипоталамо-гипофизарная системы. Эффектом активации симпато-адреналовой системы является повышение гормонов адреналина и норадреналина, а следствием активации гипоталамо-гипофизарной системы, и в частности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, является увеличение секреции гормона кортизола. При этом имеются данные о том, что тиреотоксикоз сопровождается гиперкортизолемией.

Известно, что секреция гормона кортизола находится под контролем цитокинов, а последствиями активации гормона являются изменения в разных системах организма, в том числе в состоянии системы крови.

Содержание

Реферат.....	2
Аннотация.....	3
Содержание.....	4
Введение.....	5
1 Обзор литературы.....	6
1.1 Гипоталамо-гипофизарная система.....	6
1.1.1 Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система.....	8
1.1.2 Кортизол.....	10
1.2 Интерлейкин-1 бета.....	13
1.3 Интерлейкин-6.....	14
1.4 Эритроциты крови.....	16
1.5 Лейкоциты.....	19
1.5.1 Лимфоциты.....	19
1.5.2 Эозинофилы.....	22
1.6 Иммуноферментный анализ.....	24
2 Материалы и методы.....	27
3 Результаты и обсуждения.....	38
Заключение.....	39
Список использованных источников.....	40

Введение

Диффузный токсический зоб – заболевание, вызванное гипертрофией и гиперфункцией щитовидной железы, сопровождающееся развитием тиреотоксикоза. Ведет к изменениям в сердечно-сосудистой и нервной системах, развитию сердечной или надпочечниковой недостаточности[1].

Стресс-реакция – физиологическая реакция в организме человека, развивающаяся как результат воздействия на него разных негативных факторов. Данная реакция регулируется гормонами[2]. Организм человека, реагируя на стресс, активирует широкий спектр поведенческих и физиологических реакций. Кортикотропин-рилизинг-фактор (КРФ) играет центральную роль в реакции на стресс. В ответ на стресс фактор инициирует каскад событий, кульминацией которых является выброс глюкокортикоидов из коры надпочечников. Эти гормоны, в частности кортизол, влияют на все системы организма, в том числе и на систему крови[3].

Цель: исследовать механизмы и последствия активации гипоталамо-гипофизарной системы в условиях патологии «Диффузно-токсический зоб».

Задачи:

- 1) исследовать уровень гормона кортизола в сыворотке крови больных ДТЗ,
- 2) оценить содержание цитокинов: интерлейкина-1 бета и интерлейкина-6 в сыворотке крови при ДТЗ,
- 3) исследовать кислотно резистентность, возрастной состав и содержание эритроцитов крови у больных ДТЗ,
- 4) оценить морфологический состав лейкоцитов крови при ДТЗ,
- 5) построить схему взаимосвязи исследуемых показателей при патологии «Диффузно-токсический зоб».

1 Обзор литературы

1.1 Гипоталамо-гипофизарная система

Гипоталамус можно считать координирующим центром эндокринной системы. Он объединяет сигналы, поступающие от верхних корковых входов, вегетативной функции, сигналов окружающей среды, таких как свет и температура, и периферической эндокринной обратной связи. В свою очередь, гипоталамус доставляет точные сигналы в гипофиз, который затем выделяет гормоны, которые влияют на большинство эндокринных систем в организме. В частности, гипоталамо-гипофизарная система напрямую влияет на функции щитовидной железы, надпочечников и половых желез, а также влияет на рост, выработку молока и водный баланс [4].

Гипоталамус также участвует в нескольких важных неэндокринных функциях, таких как регулирование температуры, деятельность вегетативной нервной системы и контроль аппетита.

Анатомия и уникальное кровоснабжение гипоталамо-гипофизарной оси имеют важное значение для его функции. Гормоны гипоталамуса представляют собой небольшие пептиды, которые обычно активны только при относительно высоких концентрациях, достигаемых в портальной системе гипофиза. Их небольшой размер и отсутствие известных связывающих белков приводит к быстрой деградации и очень низким концентрациям в периферическом кровообращении. Однако эктопическая продукция некоторых из этих гормонов была идентифицирована как нормальными лейкоцитами, так и опухолями хромоаффинных клеток. Также были идентифицированы рецепторы периферических гормонов, хотя их физиологическое значение не известно[5].

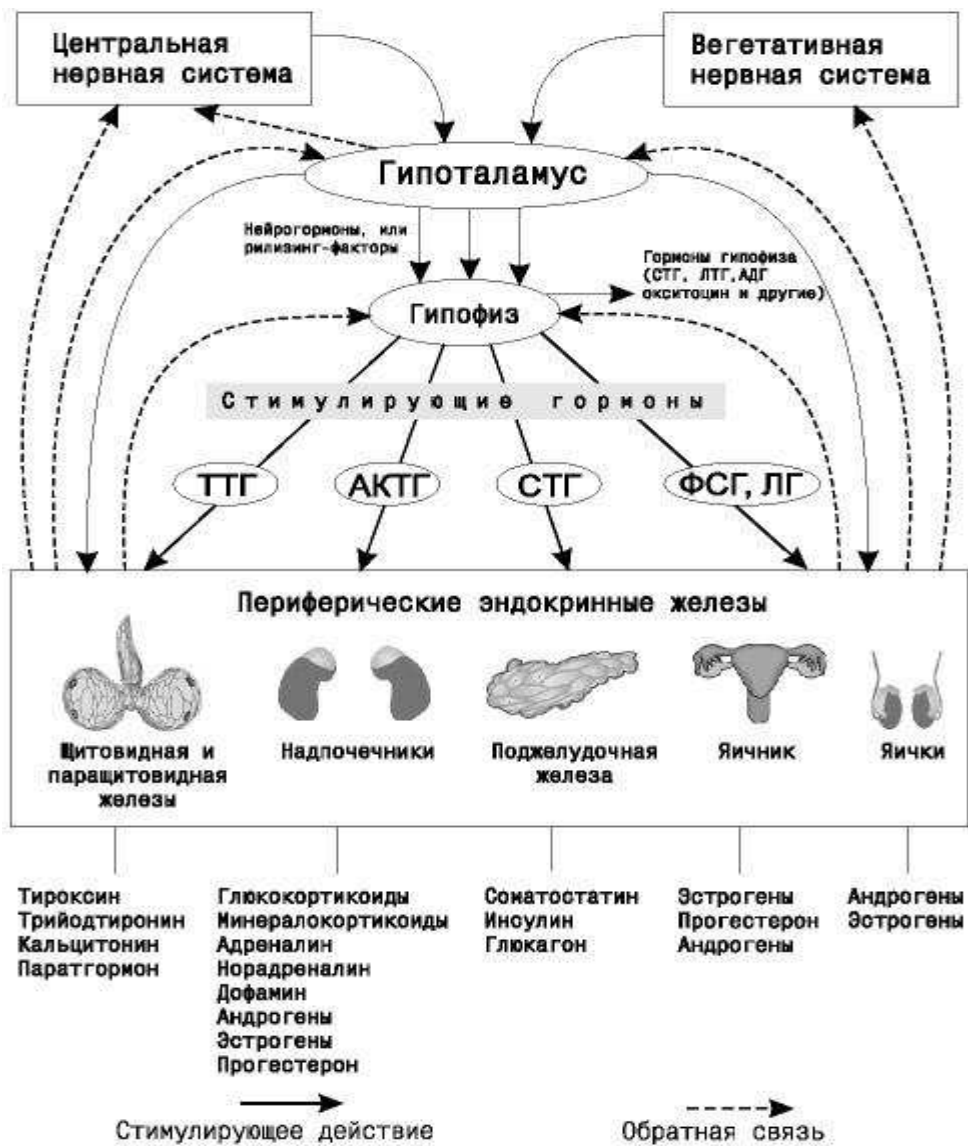


Рисунок 1– Схема гипоталамо-гипофизарной системы[6]

1.1.1 Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система

Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система (ГГН) представляет набор действий и ответных реакций между гипоталамусом, гипофизом и надпочечниками. Система помогает регулировать температуру, пищеварение, иммунную систему, настроение, определяет пол и общую энергию. Он также играет важную роль в контроле реакций на стресс[7].

Гипоталамус и гипофиз расположены в головном мозге, надпочечники находятся над почками. Гипоталамус контролирует голод, усталость, сон и температуру тела и выделяет гормоны. Он тесно связан с гипофизом, потому что вырабатываемые им гормоны стимулируют или подавляют гипофиз, чтобы секретировать его гормоны, которые также контролируют функции организма. Надпочечники, помимо регулирования функции почек, также выделяют гормоны, которые являются частью реакции на стресс[8].

Функция гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы сложна и имеет много функций, но большинство из них связано с регулированием воздействия стресса на функции организма. Первый шаг в этом процессе происходит в гипоталамусе, который выделяет гормоны под названием релизинг-гормоны в ответ на стресс[9]. Релизинг-гормоны затем стимулируют гипофиз, который выделяет адренотропный гормон (АКТГ). В свою очередь, АКТГ стимулирует надпочечники, которые выделяют кортизол. Кортизол отвечает, помимо прочего, за замедление воспалительного ответа иммунной системы и контроль артериального давления[10].

Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система поддерживает равновесие посредством системы положительной и отрицательной обратной связи. Это зависит от количества кортизола в крови, уровня стресса и цикла бодрствования/сна. Если, например, уровень кортизола становится слишком высоким, стимулируется гипоталамус и гипофиз, и они уменьшают выработку гормонов, которые начали процесс, тем самым поддерживая

равновесие тела. Постоянное напряжение любого вида может привести к дисфункции системы[11].

Многие из проблем, с которыми связана система, являются расстройствами настроения, такими как тревожное расстройство, биполярное расстройство и бессонница. Он также является фактором синдрома хронической усталости, фибромиалгии и выгорания. Постоянное напряжение гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы также может быть фактором, способствующим синдрому раздраженного кишечника и алкоголизму[12]. Многие расстройства настроения лечат антидепрессантами, которые функционируют путем регулирования этой системой[13].

Много исследований было сделано по гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системе и ее связям со стрессом. Одна из интересных вещей, которую стоит отметить в исследовании, это то, что его можно проводить на разных животных, а не только на людях. Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система на самом деле является общей для всех млекопитающих, а также некоторых других позвоночных[3].

1.1.2 Кортизол

Кортизол – гормон стероидной природы в классе глюкокортикоидов. В качестве лекарства, он известен как гидрокортизон. В основном он производится в пучковой зоне коры надпочечников. Он зависит от суточного цикла, и его выработка увеличивается в ответ на стресс и низкую концентрацию глюкозы в крови. Выделение кортизола контролируется гипоталамусом. Секреция кортикотропин-рилизинг-гормона гипоталамусом запускает клетки в передней доле гипофиза, чтобы секретировать адренокортикотропный гормон (АКТГ), в сосудистую систему, по которой гормон переносится в кору надпочечников. АКТГ стимулирует синтез кортизола и других глюкокортикоидов, минералокортикоидов и половых гормонов[14].

Кортизол помогает вырабатывать глюкозу, повышает частоту сердечных сокращений и артериальное давление, а также отключает пищеварительную и репродуктивную функции. Помимо краткосрочной реакции на стресс, кортизол также регулирует ежедневные функции вашего организма. Это помогает контролировать ваше кровяное давление и частоту сердечных сокращений, чтобы поддерживать гомеостаз[15].

В сочетании с инсулином кортизол регулирует процесс расщепления углеводов, белков и жиров в соответствии с потреблением энергии и потребностями вашего организма.

Другие факторы, которые влияют на уровень кортизола, включают естественное и искусственное воздействие света, время года, продолжительность дня, время приема пищи и пребывание в городских или естественных условиях[16].

Секреция кортизола в основном контролируется тремя взаимосвязанными областями тела; гипоталамусом в головном

мозге, гипофизом и надпочечниками. Когда уровень кортизола в крови низкий, группа клеток в области мозга, называемой гипоталамусом, выделяет кортикотрофин-рилизинг-гормон, который заставляет гипофиз секретировать другой гормон, аденокортикотропный гормон. в кровотоке[17]. Высокие уровни аденокортикотропного гормона выявляются в надпочечниках и стимулируют секрецию кортизола, вызывая повышение уровня кортизола в крови. По мере повышения уровня кортизола они начинают блокировать высвобождение кортикотрофин-рилизинг-гормона из гипоталамуса и аденокортикотропного гормона из гипофиза. В результате уровень аденокортикотропного гормона начинает падать, что приводит к падению уровня кортизола. Это называется отрицательной обратной связью. Кортизол также находится под контролем цитокинов: интерлейкина-1бета и интерлейкина-6[18].

Высокий уровень кортизола в течение длительного периода времени может привести к состоянию, называемому синдромом Кушинга. Синдром может быть вызван целым рядом факторов, таких как опухоль, которая продуцирует аденокортикотропный гормон (и, следовательно, увеличивает секрецию кортизола), или прием определенных типов лекарств[19]. Симптомы включают в себя:

- быстрое увеличение веса в основном на лице, груди и животе по сравнению со стройными руками и ногами
- покрасневшее и круглое лицо
- повышенное артериальное давление
- остеопороз
- изменения кожи (ушибы и фиолетовые растяжки)
- мышечная слабость
- перепады настроения, которые проявляются как беспокойство, депрессия или раздражительность
- повышенная жажда и частота мочеиспускания[20].

Также высокий уровень кортизола может вызывать отсутствие полового влечения, а у женщин периоды менструации могут становиться нерегулярными, менее частыми или полностью прекращаться (аменорея)[21].

Низкий уровень кортизола может быть вызван проблемами с гипофизом или надпочечниками (болезнь Аддисона). Проявление симптомов постепенное. Симптомы могут включать усталость, головокружение (особенно при стоянии), потерю веса, мышечную слабость, изменения настроения и потемнение участков кожи[22].

1.3 Интерлейкин-1 бета

Интерлейкин (IL)-1 β является важным медиатором воспалительного ответа и участвует в пролиферации, дифференцировке и апоптозе клеток. Предшественник IL-1 β расщепляется цитозольной каспазой 1 (интерлейкин-1-бета-конвертаза) с образованием зрелого IL-1 β [23].

Мощный провоспалительный цитокин. Первоначально обнаруженный в качестве основного эндогенного пирогена, он индуцирует синтез простагландина, приток и активацию нейтрофилов, активацию Т-клеток и выработку цитокинов, активацию В-клеток и выработку антител, а также пролиферацию фибробластов и выработку коллагена. Способствует дифференцировке Th17 Т-клеток. Синергизируется с интерлейкином-12 для индукции синтеза IFNG из клеток Т-хелперов 1 (Th1)[24].

ИЛ-1 β является членом семейства интерлейкина-1. Этот цитокин вырабатывается активными макрофагами в виде пропротеина, который протеолитически перерабатывается в свою активную форму каспазой 1 (CASP1 / ICE). Цитокин также является важным медиатором воспалительного ответа и участвует в различных клеточных активностях, включая пролиферацию, дифференцировку и апоптоз клеток. Установлено, что индукция циклооксигеназы-2 (PTGS2 / COX2) этим цитокином в центральной нервной системе (ЦНС) способствует гиперчувствительности при воспалительных болях[25].

ИЛ-1 β в сочетании с ИЛ-23 индуцировал экспрессию ИЛ-17, ИЛ-21 и ИЛ-22 $\gamma\delta$ Т-клетками. Эта индукция экспрессии происходит в отсутствие дополнительных сигналов. Это говорит о том, что ИЛ-1 β участвует в модуляции аутоиммунного воспаления[26].

1.4 Интерлейкин-6

Интерлейкин-6 (ИЛ-6) представляет собой интерлейкин, который действует как провоспалительный цитокин и противовоспалительный миокин[27]. Интерлейкин-6 (IL-6) играет важную роль как во врожденном, так и в адаптивном иммунитете. IL-6 может продуцироваться различными типами клеток например: макрофагами, эндотелиальными клетками и Т-клетками. Эта продукция может быть инициирована в ответ на микробную инвазию или другие цитокины, такие как фактор некроза опухоли. Как часть врожденной иммунной системы, ИЛ-6 действует на гепатоциты, вызывая экспрессию С-реактивного белка, фибриногена и сывороточного амилоида А, также известного как реакция острой фазы. В рамках адаптивного иммунного ответа IL-6 играет ключевую роль в активации В-клеток, продуцирующих антитела, для пролиферации, что приводит к усиленному ответу антител[28].

Концентрации IL-6 повышены у пациентов с инфекцией и сепсисом. Повышение уровня IL-6 также, по-видимому, связано с более локализованными инфекциями, такими как инфекции протезного сустава. Существуют доказательства того, что IL-6 участвует в патогенезе некоторых хронических воспалительных заболеваний[29].

Интерлейкин-6 вызывает воспалительные эффекты, индуцируя транскрипцию факторов в нескольких путях воспаления. Они могут происходить с протеинкиназой С, цАМФ / протеинкиназой А и высвобождением кальция[30]. IL-6 представляет собой молекулу с множеством форм и функций, в зависимости от того, где он секретруется. Это включает:

- Стимуляция острых фазовых реакций. Они способствуют активации врожденного иммунитета, предотвращая повреждение тканей. Когда печень секретирует эти реагенты острой фазы, другие

белки, такие как альбумин и трансферрин, обязательно секретируются в меньших количествах. Двумя основными белками острой фазы являются С-реактивный белок (СРБ) и сывороточный амилоид А (SAA). В то время как СРБ стимулирует фагоцитоз, интерлейкин-6 усиливает продукцию фактора свертывания крови фибриногена. Продукция реактивов острой фазы вызывает начало лихорадки, высокие уровни глюкокортикоидов, активацию путей комплемента и путей коагуляции с высоким СОЭ, и другие проявления.

- Интерлейкин-6 также помогает Т-клеткам дифференцироваться на ранних стадиях своего развития. Он необходим для развития клеток-предшественников, а также для активации Т-клеток и НК-клеток. Кроме того, это помогает им достичь лизиса патогенов внутри клеток.

- Интерлейкин-6 также помогает В-клеткам дифференцироваться и пролиферировать, а также способствует образованию плазматических клеток из В-клеток. Кроме того, как фактор роста для этих клеток, он усиливает высвобождение антител в форме IgA и IgG.

- Интерлейкин-6 также жизненно важен для развития клеток крови, будь то белые клетки, эритроциты или тромбоциты.

- IL-6 также приводит к активации остеокластов и остеопороза. Он также индуцирует секрецию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), что приводит к увеличению роста сосудов и проницаемости сосудов при воспалении[31].

Дефицит интерлейкина-6 оказывает глубокое влияние на иммунную активацию и антитела IgA. С другой стороны, избыточная экспрессия интерлейкина-6 имеет не менее важные эффекты. Дефектная регуляция IL-6 может также вызывать лимфоидные злокачественные новообразования и может быть связана с мутацией в гене IL-6[32].

1.5 Эритроциты крови

Эритроциты – красные кровяные тельца, содержащие гемоглобин. Эритроцит имеет так называемую двояковогнутую форму. Обе стороны поверхности клетки изгибаются внутрь, как внутренняя часть сферы.

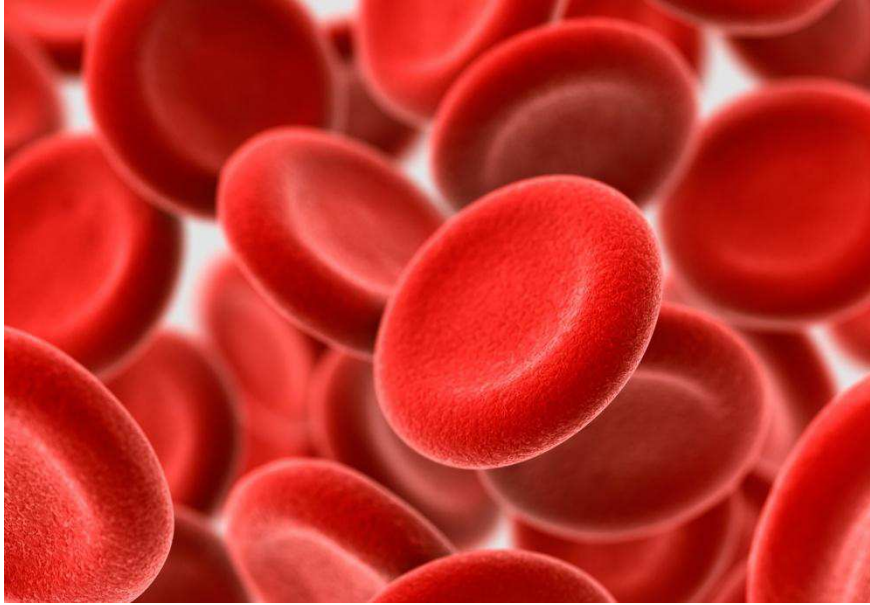


Рисунок 2 – Структура эритроцита[33]

Эта форма способствует способности эритроцитов доставлять кислород через крошечные кровеносные сосуды к органам и тканям. Эритроциты имеют уникальную структуру. Их гибкая форма диска помогает увеличить отношение площади поверхности к объему этих чрезвычайно маленьких ячеек. Это позволяет кислороду и углекислому газу легче распространяться через плазматическую мембрану эритроцита[34]. Эритроциты содержат огромное количество белка, называемого гемоглобином. Эта железосодержащая молекула связывает кислород, когда молекулы кислорода попадают в легкие в кровеносные сосуды [35].

Зрелые эритроциты не содержат ядра, митохондрий или рибосом. Их отсутствие оставляет место для молекул гемоглобина. Мутация в гене гемоглобина может привести к развитию серповидных клеток и привести к серповидноклеточному расстройству[36].

Эритроциты также важны для определения группы крови человека. Тип крови определяется наличием или отсутствием определенных идентификаторов (антигенов) на поверхности эритроцитов. Они помогают иммунной системе организма распознавать собственный тип эритроцитов[37].

Эритроциты происходят из стволовых клеток красного костного мозга. Выработка новых красных кровяных клеток, также называемая эритропоэзом, вызвана низким уровнем кислорода в крови. Низкий уровень кислорода может возникать по разным причинам, включая потерю крови, присутствие на большой высоте, физические упражнения, повреждение костного мозга и низкий уровень гемоглобина[38].

Когда почки обнаруживают низкий уровень кислорода, они производят и выделяют гормон эритропоэтин. Эритропоэтин стимулирует выработку эритроцитов красным костным мозгом. Чем больше эритроцитов попадает в кровообращение, тем выше уровень кислорода в крови и тканях. Когда почки ощущают повышение уровня кислорода в крови, они замедляют выделение эритропоэтина. В результате, производство красных кровяных клеток уменьшается[39].

Эритроциты циркулируют в среднем около четырех месяцев. Взрослые имеют в крови около 25 триллионов эритроцитов в любой момент времени. Из-за отсутствия ядра и других органелл взрослые эритроциты не могут подвергаться митозу, чтобы делиться или генерировать новые клеточные структуры. Когда они стареют или повреждаются, подавляющее большинство эритроцитов выводится из кровотока селезенкой, печенью и лимфатическими узлами. Эти органы и ткани содержат лейкоциты, называемые макрофагами, которые поглощают и переваривают поврежденные или умирающие клетки крови. Деградация эритроцитов и эритропоэз обычно происходят с одинаковой скоростью, чтобы обеспечить гомеостаз в циркуляции эритроцитов[40].

Мембрана эритроцитов состоит из 3 слоев: гликокаликс снаружи, богатый углеводами; липидный бислой, который содержит большое количество трансмембранных белков, помимо его липидных основных компонентов; и мембранный скелет, структурная сеть белков, расположенных на внутренней поверхности липидного бислоя. Половина мембранной массы в эритроцитах человека и большинства млекопитающих составляют белки. Другая половина - липиды, а именно фосфолипиды и холестерин[41]. Измерение стойкости мембраны эритроцитов осуществляется по методу кислотных эритрограмм. Сущность метода заключается в осуществлении фотоэлектроколориметрических измерений динамики распада эритроцитов под действием гемолитического вещества[42]. При участии кортизола на поверхности эритроцитарных мембран формируются белково-липидные домены. Избыточное содержание воды на границах доменов и возникновение в этих зонах «растягивающих» гидростатических напряжений формируют на поверхности эритроцитов мезополосы, разрыхляющие мембрану[7].

1.6 Лейкоциты

Белые клетки крови (лейкоциты) – являются клетками системы иммунитета, которые участвуют в защите организма от инфекционных заболеваний. Все белые кровяные клетки производятся и происходят из мультипотентных клеток в костном мозге, известных как гемопоэтические стволовые клетки. Лейкоциты находятся во всем организме, включая кровь и лимфатическую систему[43].

1.6.1 Лимфоциты

Лимфоциты – белые кровяные клетки, входящие в состав лейкоцитов, которые определяют специфичность иммунной реакции на инфекционные микроорганизмы и другие посторонние вещества. У взрослых людей лимфоциты составляют примерно от 20 до 40 процентов от общего количества лейкоцитов. Они находятся в кровообращении, а также концентрируются в центральных лимфоидных органах и тканях, таких как селезенка, миндалины и лимфатические узлы. Производятся в костном мозге[44].

Существуют различные типы В-клеток и Т-клеток, которые играют определенную роль в организме и иммунной системе.

В-клетки

Ячейки памяти В

В-клетки памяти циркулируют в организме, чтобы начать быстрый ответ антител, когда они находят инородное вещество. Они остаются в организме на протяжении десятилетий и становятся клетками памяти, которые запоминают ранее обнаруженные антигены и помогают иммунной системе быстрее реагировать на будущие атаки.

Регуляторные В-клетки

Оказывают защитное противовоспалительное действие на организм и останавливают лимфоциты, которые вызывают воспаление. Они также взаимодействуют с несколькими другими иммунными клетками и способствуют выработке регуляторных Т-клеток[45].

Т-клетки

Т-киллеры

Т-киллеры или цитотоксические клетки сканируют поверхность клеток в организме, чтобы определить, не заразились ли они микробами или не превратились в раковые. Если это так, они убивают эти клетки.

Т-хелперы

Т-хелперы «помогают» другим клеткам иммунной системы запускать и контролировать иммунный ответ против чужеродных веществ.

Существуют различные типы вспомогательных Т-клеток, и некоторые из них более эффективны, чем другие, против различных типов микробов.

Например, клетка Th1 более эффективна против микробов, вызывающих инфекцию внутри других клеток, таких как бактерии и вирусы, тогда как клетка Th2 более эффективна против микробов, вызывающих инфекцию вне клеток, таких как некоторые бактерии и паразиты.

Регуляторные Т-клетки

Контролируют или подавляют другие клетки иммунной системы. Они имеют как полезные, так и вредные последствия.

Они поддерживают толерантность к микробам, предотвращают аутоиммунные заболевания и ограничивают воспалительные заболевания. Но

они также могут подавлять работу иммунной системы против определенных антигенов и опухолей.

Т-клетки памяти

Т-клетки памяти защищают организм от ранее обнаруженных антигенов. Они живут долго после того, как инфекция закончилась, помогая иммунной системе вспомнить предыдущие инфекции.

Природные киллеры Т-клетки

Т-клетки-природные киллеры представляют собой смешанную группу Т-клеток, которые имеют общие характеристики как Т-клеток, так и природных клеток-киллеров. Они могут влиять на другие иммунные клетки и контролировать иммунные реакции против веществ в организме, которые вызывают иммунный ответ[46].

1.6.2 Эозинофилы

Эозинофилы или ацидофилы – кровяные клетки, входящие в состав лейкоцитов и один из компонентов иммунной системы, ответственных за борьбу с многоклеточными паразитами и некоторыми инфекциями. Наряду с тучными клетками и базофилами, они также контролируют механизмы, связанные с аллергией и астмой. Это гранулоциты, которые развиваются во время кроветворения в костном мозге до миграции в кровь, после чего они окончательно дифференцируются и не размножаются. Кортизол снижает уровень лимфоцитов, подавляет иммунные реакции, вызывает эозинопению и лимфопению[43].

Эозинофилы продуцируют:

- Белки катионных гранул и их высвобождение дегрануляцией
- Реакционноспособные виды кислорода, такие как гипобромит, супероксид и пероксид (гипобромная кислота, которая преимущественно продуцируется пероксидазой эозинофилов)
- Липидные медиаторы, такие как эйкозаноиды из семейства лейкотриенов и простагландинов
- Ферменты, такие как эластаза
- Факторы роста, такие как бета TGF, VEGF и PDGF
- Цитокины, такие как IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 и TNF альфа.

Существуют также эозинофилы, которые играют роль в борьбе с вирусными инфекциями, о чем свидетельствует обилие РНКаз, содержащихся в их гранулах, и удаление фибрина при воспалении. Эозинофилы, наряду с базофилами и тучными клетками, являются важными медиаторами аллергических реакций и патогенеза астмы и связаны с тяжестью заболевания. Они также борются

с колонизацией гельминтов (червей) и могут быть слегка повышены в присутствии определенных паразитов. Эозинофилы также участвуют во многих других биологических процессах. Кроме того, они участвуют в презентации антигена к Т-клеткам[44].

Эозинофилы ответственны за повреждение тканей и воспаление при многих заболеваниях, включая астму. Высокие уровни интерлейкина-5, как было установлено, повышают экспрессию молекул адгезии, которые затем облегчают адгезию эозинофилов к эндотелиальным клеткам, вызывая тем самым воспаление и повреждение тканей[45].

Большое количество эозинофилов на микролитр крови означает, что у вас расстройство, известное как эозинофилия. Эозинофилия классифицируется как легкая (500–1500 эозинофильных клеток на микролитр), умеренная (от 1500 до 5000 эозинофильных клеток на микролитр) или тяжелая (более 5000 эозинофильных клеток на микролитр). Это может быть связано со следующими причинами: инфекция от паразитических червей, аутоиммунное заболевание, тяжелые аллергические реакции, экзема, астма, сезонные аллергии, лейкоз и некоторые другие виды рака, язвенный колит, скарлатина, волчанка, болезнь Крона, значительная лекарственная реакция, отторжение трансплантата органа.

Аномально низкий уровень эозинофилов может быть результатом интоксикации алкоголем или чрезмерной выработкой кортизола, как при болезни Кушинга. Низкое количество эозинофилов также может быть связано со временем суток. В нормальных условиях количество эозинофилов самое низкое утром и самое высокое вечером[46].

1.7 Иммуноферментный анализ

Ферментно-связанный иммуносорбентный анализ (ELISA), также называемый энзиматическим иммуноанализом, биохимическая процедура, при которой сигнал, генерируемый ферментативной реакцией, используется для обнаружения и количественного определения количества конкретного вещества в растворе[47]. Ферментно-связанные иммуносорбентные анализы (ELISA) обычно используются для обнаружения антигенов, хотя их также можно использовать для обнаружения других веществ, включая антитела, гормоны и лекарственные препараты. ИФА чувствительны и специфичны, а также относительно недороги, что делает их полезными в качестве инструментов предварительной диагностики. ELISA широко используются, например, при тестировании на вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) и аналогичных применениях[48].

Ключевым аспектом ELISA является то, что антитела, селективные для интересующего вещества, фиксируются на твердой поверхности (например, лунки полистирольного многолуночного планшета). Тестируемый раствор добавляют в лунки с последующим добавлением конъюгата антитело-фермент. Затем пластину осторожно промывают, чтобы удалить несвязанный ферментный конъюгат, и добавляют субстрат фермента (вещество, которое он модифицирует). Фермент, который стал связанным с антителом в лунках, будет реагировать, производя цветной продукт, который можно обнаружить и измерить с помощью спектрофотометрии[49].

ELISA «сэндвич» используется для обнаружения образца антигена.

Изображение включает в себя использование вторичного антитела, конъюгированного с ферментом, хотя в техническом смысле это не является необходимым, если первичное антитело конъюгировано с ферментом (что будет прямым ИФА). Однако использование конъюгата вторичного антитела позволяет избежать дорогостоящего процесса создания антител, связанных с

ферментом, для каждого антигена, который может потребоваться обнаружить[50]. При использовании связанного с ферментом антитела, которое связывает Fc-область других антител, это же самое связанное с ферментом антитело может быть использовано в различных ситуациях. Без первого слоя «захватывающего» антитела любые белки в образце (включая сывороточные белки) могут конкурентно адсорбироваться на поверхности планшета, снижая количество иммобилизованного антигена. Использование очищенного специфического антитела для прикрепления антигена к пластику устраняет необходимость очищать антиген из сложных смесей перед измерением, упрощая анализ и повышая специфичность и чувствительность анализа. Сэндвич-ИФА, используемый для исследований, часто нуждается в проверке из-за риска ложноположительных результатов[51].

ELISA - конкурентное связывание.

Некоторые конкурентные наборы ELISA включают фермент-связанный антиген, а не фермент-связанное антитело. Меченый антиген конкурирует за первичные сайты связывания антител с образцом антигена (немеченого). Чем меньше антигена в образце, тем больше меченого антигена сохраняется в лунке и тем сильнее сигнал. Обычно антиген сначала не помещается в лунку[52].

Для обнаружения антител к ВИЧ лунки планшета для микротитрования покрывают антигеном ВИЧ. Используются два специфических антитела, одно из которых конъюгировано с ферментом, а другое присутствует в сыворотке (если сыворотка положительна для антитела). Кумулятивная конкуренция происходит между двумя антителами за один и тот же антиген, вызывая более сильный сигнал[53]. Тестируемые сыворотки добавляют в эти лунки и инкубируют при 37°C, а затем промывают. Если антитела присутствуют, происходит реакция антиген-антитело. Не осталось антигена для меченых ферментом специфических антител к ВИЧ. Эти антитела остаются свободными при добавлении и смываются во время

мытья. Добавляется субстрат, но на него не действует фермент, поэтому положительный результат не показывает изменения цвета[54].

2 Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовались цельная кровь, сыворотка крови здоровых людей (n=28) и больных людей с ДТЗ (n=54). Группу исследования составили женщины в возрасте 40-45 лет. Кровь была взята утром натощак из локтевой вены.

Определение кортизола методом иммуноферментного анализа

Принцип метода

Метод основан на твердофазном конкурентном иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца и конъюгата кортизол-пероксидаза, во время инкубации происходит конкурентное связывание сывороточного кортизола и кортизола, конъюгированного с пероксидазой, с моноклональными антителами к кортизолу, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок планшета.

При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободного и связанного антителами конъюгата кортизол-пероксидаза, причем количество связанного антителами конъюгата обратно пропорционально количеству концентрации кортизола в анализируемом образце сыворотки крови.

Во время инкубации с ТМБ-Субстратным раствором происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорционально количеству связанного антителами конъюгата кортизол-пероксидаза. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация кортизола в исследуемых образцах. Для анализа использовался набор для количественного определения кортизола методом иммуноферментного

анализа (ДС-ИФА-Стероид-Кортизол), являющийся продукцией ООО Научно–Производственного Объединения «Диагностические системы».

Состав набора

1) Иммуносорбент - полистероловый 96-луночный разборный планшет с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к кортизолу - 1 шт;

2) Конъюгат - кортизол, меченный пероксидазой хрена, прозрачная опалесцирующая жидкость розового цвета - 1 фл. (12мл);

3) 6 калибровочных проб на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества кортизола, прозрачные или опалесцирующие жидкости светло-желтого цвета;

4) Контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием кортизола, прозрачная или опалесцирующая жидкость светло-желтого цвета - 1 фл. (0,5 мл);

5) промывочный раствор, 25-кратный концентрат, прозрачная слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °С и встряхивании - фл. (50 мл) ;

6) ТМБ-Субстратный раствор; прозрачная бесцветная жидкость - 1 фл. (12 мл.);

7) Стоп-реагент (0,2 М серная кислота), прозрачная бесцветная жидкость -1 фл. (15 мл.);

8) Инструкция по применению - 1 шт.

Проведение анализа

1. Стандартные калибровочные пробы и контрольную сыворотку вносить по 25 мкл в двух повторах. Рекомендуется оставить 2 лунки для измерения ОП ТМБ - Субстратного раствора. В остальные лунки внести по 25 мкл исследуемых образцов сыворотки крови в двух повторах.

2. Во все лунки планшета, кроме лунок с контролем ТБ - Субстратного раствора, внести по 100 мкл коньюгата, планшет закрыть крышкой или защитной пленкой.

3. Возможны две процедуры инкубации планшета:

Процедура 1 (термостатируемый шейкер, (37,0 0,5)0С):

Планшет инкубировать в течение 30 минут на термостатируемом шейкере при встряхивании со скоростью от 500 до 800 об/мин и температуре (37,0 0,5)0С.

Процедура 2 (комнатная температура):

После внесения в лунки планшета образцов и коньюгата содержимое перемешать аккуратным постукиванием по краям планшета в течение 30

секунд, стрипы закрыть крышкой или защитной пленкой и инкубировать в течение 60 минут при комнатной температуре (здесь 20 - 250С).

4. По окончании инкубации содержимое лунок удалить с помощью промывочного устройства в емкость для сбора инфицированного материала, планшет промыть 5 раз рабочим ПР, добавляя во все лунки планшета не менее 300 мкл рабочего ПР и удаляя рабочий ПР с помощью промывочного устройства в емкость для сбора инфицированного материала. После последнего промывания тщательно удалить остатки жидкости из лунок

постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

5. Немедленно внести во все лунки планшета по 100 мкл ТБ - Субстратного раствора и выдержать при комнатной температуре в темноте:

Процедура 1: 20 - 30 минут.

Процедура 2: 20 - 30 минут.

6. Реакцию остановить добавлением во все лунки планшета по 150 мкл стоп - реагента, встряхнуть стрипы на шейкере в течение 5 - 10 секунд и провести учет результатов. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 20 мин.

7. Спектрофотометрический контроль внесения сывороток и реагентов при постановке тест - системы «ДС - ИФА - Стероид - Кортизол » на автоматических ИФА - анализаторах.

Контроль внесения конъюгата рекомендуется проводить при длинах волн 540 (550) нм, критерий ОП > 0,500.

Иммуноферментное определение концентрации интерлейкина-1 бета в сыворотке крови

Метод определения основан на трехстадийном «сэндвич» – варианте твердофазного иммуноферментного анализа с использованием моно- и поликлональных антител ИЛ-1 бета.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют в лунках с иммобилизованными антителами. Имеющийся в образцах ИЛ-1 бета связывается с иммобилизованными антителами. Связавшийся ИЛ-1 бета взаимодействует при инкубации с конъюгатом №1 (антитела к ИЛ-1 бета человека с биотином). На третьей стадии связавшийся

конъюгат №1 взаимодействует при инкубации с конъюгатом №2 (стрептавидин с пероксидазой хрена).

Количество связавшегося конъюгата №2 определяют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы хрена - перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Интенсивность желтого окрашивания пропорциональна количеству содержащегося в образце ИЛ-1 бета.

После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация ИЛ-1 бета в анализируемых образцах.

Аналитические и диагностические характеристики:

1. Специфичность.

Не обнаружено перекрестной реакции моноклональных антител к ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-2, ИЛ-18, ИЛ-17, ИНФ-гамма, ИЛ-10, ФНО-альфа, ИНФ-альфа, рецепторному антагонисту ИЛ-1.

2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания ИЛ-1 бета в одном и том же образце с использованием набора «Интерелейкин-1 бета - ИФА - БЕСТ» не превышает 8%.

3. Чувствительность.

Минимальная достоверность, определяемая набором концентрации ИЛ-1 бета, не превышает 1 пг/мл.

4. Диапазон измеряемых концентраций 0-250 пг/мл.

5. Клиническая проверка.

Средняя концентрация ИЛ-1 бета составила 1,6 пг/мл, диапазон 0-11 пг/мл.

Иммуноферментное определение концентрации интерлейкина-6 в сыворотке крови

Метод определения основан на трехстадийном «сэндвич» - варианте твердофазного иммуноферментного анализа с использованием моно- и поликлональных антител ИЛ-6.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют в лунках с иммобилизованными антителами. Имеющийся в образцах ИЛ-6 связывается с иммобилизованными антителами. Связавшийся ИЛ-6 взаимодействует при инкубации с конъюгатом №1 (антитела к ИЛ-6 человека с биотином). На третьей стадии связавшийся конъюгат №1 взаимодействует при инкубации с конъюгатом №2 (стрептавидин с пероксидазой хрена).

Количество связавшегося конъюгата №2 определяют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы хрена – перекиси водорода и хромогена - тетраметилбензидина. Интенсивность желтого окрашивания пропорциональна количеству содержащегося в образце ИЛ-6.

После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация ИЛ-6 в анализируемых образцах.

Аналитические и диагностические характеристики:

1. Специфичность.

Не обнаружено перекрестной реакции моноклональных антител к ИЛ-4, ИЛ-8, ИЛ-2, ИЛ-18, ИЛ-17, ИНФ-гамма, ИЛ-10, ФНО-альфа, ИНФ-альфа, рецепторному антагонисту ИЛ-1, ИЛ-1 бета.

2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания ИЛ-6 в одном и том же образце с использованием набора «Интерелейкин-6 - ИФА - БЕСТ» не превышает 8%.

3. Чувствительность.

Минимальная достоверность, определяемая набором концентрации ИЛ-6, не превышает 0.5 пг/мл.

4. Диапазон измеряемых концентраций 0-300 пг/мл.

5. Клиническая проверка.

Концентрацию ИЛ-6 измеряли в сыворотке (плазме) крови, взятой с 9 до 11ч, у 68 здоровых лиц в возрасте 20-50 лет. Средняя концентрация ИЛ-6 составила 2 пг/мл, диапазон 0-10 пг/мл.

Определение кислотной резистентности эритроцитов

Готовят раствор хлорида натрия 0,85-0,9%. Стандартный раствор гемолитика изготавливают из фиксанала соляной кислоты хлорида натрия.

Измерение кинетики гемолиза производится на установке, основой которой является фотоэлектрический колориметр. Для этого в левую кювету наливают изотонический раствор и устанавливают прибор в нулевое положение; готовят стандартную взвесь эритроцитов. Для этого левый барабан прибора выводят на показание 0,700 по шкале оптической плотности, что соответствует разведению крови 1 на 1000, вследствие этого равенство световых потоков нарушается, и стрелка гальванометра отклоняется от нулевого положения. В кювету, содержащую физиологический раствор, вводят пипеткой взвесь эритроцитов до тех пор, пока они своим рассеянием не уравнивают световые потоки, и стрелка гальванометра не вернется к нулю.

Из кюветы, содержащей теперь стандартную концентрацию эритроцитов, специальной пипеткой отбирают 2 мл взвеси, излишек удаляют водоструйным насосом, 2 мл возвращают в кювету.

Отдельной пипеткой отмеряют 2 мл стандартного гемолитика и при помешивании быстро вводят в кювету. Таким образом, в кювете создается

определенная концентрация эритроцитов и гемолитика (0,04N HCL)
Температура строго поддерживается $24^{\circ} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

В стабильных условиях начинается распад эритроцитов, измеряемый по падению светорассеяния взвеси. Падение светорассеяния нарушает равенство световых потоков в плечах прибора, вызывая отклонения стрелки гальванометра. Выравнивание освещенности осуществляется поворотом барабана, связанного с диафрагмой. Угол поворота, необходимый для восстановления нулевого положения стрелки гальванометра, отсчитывается по шкале оптической плотности и является мерой степени гемолиза. Падение оптической плотности в этих условиях линейно связано с числом распадающихся эритроцитов.

Мерой стойкости в этом методе служит время, прошедшее от введения кислоты до распада характеризуемой группы эритроцитов. Отсчет показаний прибора производят через каждые 30 секунд. Счет времени начинается с момента введения кислоты.

В результате опыта получается ряд значений оптической плотности, соответствующих распределению эритроцитов по стойкости, причем число групп эритроцитов, которые удастся выделить, определяется числом сделанных отсчетов. Отсчеты ведутся до тех пор, пока не будет получаться 2-3 совпадающих показания, что служит признаком конца гемолиза. Все эритрограммы подвергаются единообразному первичному расчету, где в первой и второй графах таблицы указаны время гемолиза (в минутах) и полученные в отсчетах соответствующие значения экстинции, в таблице 1 представлены данные эритрограмм с кровью здорового человека, в таблице 2 представлена разность экстинции. В третьей графе даны разности экстинции (ΔE) между соседними отсчетами, то есть количественно выражают особую группу эритроцитов, стойкость которой определяется временем, прошедшим от начала гемолиза до этого отсчета. Разница между экстинцией по окончании гемолиза принимается за 100 и в четвертой графе таблицы вычисляется процент ΔE , отражающий процент эритроцитов данной

стойкости (%Э). Этим достигается независимость результатов от индивидуальных колебаний числа эритроцитов и количества гемоглобина.

Определение содержания эритроцитов электроколориметрическим методом

Пипеткой отмерьте 8 мл разводящего раствора (3,5% раствор NaCl), перенесите в сухую пробирку. Далее добавьте 1 капилляр Сали крови, что составляет 20 мкл. Затем произведите измерение оптической плотности на ФЭКе при красном светофильтре в кювете толщиной 3 мм. Предварительно нужно выставить ноль по разводящему раствору. Показания снимайте по левой красной шкале. Полученный результат оптической плотности нужно умножить на 10^7 , в результате получается количество эритроцитов в 1 мкл (мм³) крови.

Определение морфологического состава лейкоцитов крови

Каплю крови помещают на край чистого обезжиренного предметного стекла и делают мазок с помощью другого предметного стекла со шлифованным краем. Вторым предметным стеклом со шлифованным краем прикасаются к капле крови и как только капля, коснувшись подвижного стекла, разойдется по линии соприкосновения стекол, верхним стеклом, держа его под углом 45° , проводят по первому стеклу в направлении от капли, чтобы получился мазок. Мазок должен быть достаточно тонким, чтобы клетки крови располагались в один слой; в то же время следует избегать чрезмерного надавливания, для избежания деформации лейкоцитов.



Рисунок 3 – Техника выполнения мазка

Приготовленные мазки высушивают на воздухе и затем фиксируют метиловым или этиловым спиртом. Окраска фиксированного мазка производится свежеприготовленным водным раствором краски Романовского-Гимза. Для этого на 1 мл воды добавляют 1 каплю краски (~40мкл). Для получения хорошей окраски рН воды должно составлять ~6,8-6,9. На один мазок требуется 2-3 мл водного раствора краски. Окрашивание производится нанесением водного раствора краски каплями на горизонтально расположенный на подставках в ванночке мазок до полного покрытия мазка. Красится 15-20 мин, после чего краска смывается холодной водопроводной водой, далее мазок сушится на воздухе.

Окрашенный и высушенный мазок исследуется под микроскопом с иммерсией. На мазок наносится капля иммерсионного масла, объектив (x90) опускается до соприкосновения с маслом, затем объектив приподнимается на 1 мм. При этом силы поверхностного натяжения удерживают масло в контакте с линзой. После этого настраивается поле зрения, медленно опуская объектив до появления контуров клеток. Для окончательной фокусировки используется микровинт. В поле зрения основную площадь занимают безъядерные эритроциты и один – несколько лейкоцитов с ядрами. Лейкоциты крупнее эритроцитов по размерам; ядра окрашены в фиолетовый цвет.

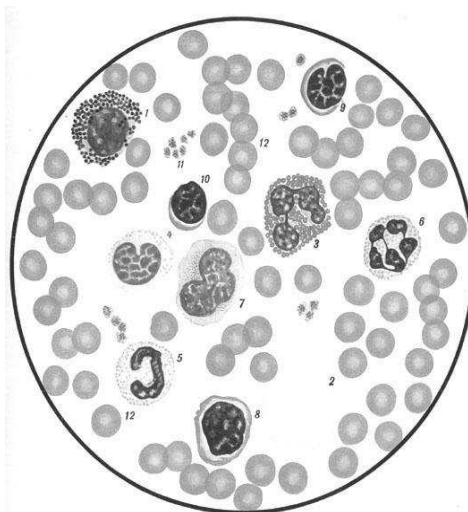


Рисунок 4 – Морфологические особенности лейкоцитов крови

Двигаясь по мазку, исследуются лейкоциты в каждом поле зрения. При движении по мазку крови рекомендуется пересекать мазок по схеме.



Рисунок 5 – Схема движения по мазку крови при исследовании морфологии лейкоцитов

Исследуются 100 лейкоцитов, идентифицируется каждый лейкоцит; подсчитывается количество лейкоцитов в каждом классе. Поскольку исследуется 100 клеток, результаты выражаются в % количестве лейкоцитов каждого типа среди всех лейкоцитов крови.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программ Microsoft Excel XP и пакета программ для статистического анализа Statistica 10.

Из текста выпускной квалификационной работы изъяты, с 38 по 45 страницу, результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам

3 Результаты и обсуждение

Из текста магистерской диссертации изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

Заключение

1. Повышение уровня кортизола у больных диффузно-токсическим зобом по сравнению с контрольной группой здоровых людей говорит об увеличении стрессового воздействия на организм и как следствие активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы; может быть также результатом вторичной активации коры надпочечников в условиях данной патологии.

2. Увеличение концентрации интерлейкина-1 бета у людей с ДТЗ, вероятно приводит к повышению уровня кортизола, а понижение концентрации интерлейкина-6 является следствием ингибирующего действия кортизола.

3. Выявленная корреляционная зависимость между пиком гемолиза эритроцитов и уровнем гормона кортизола у больных ДТЗ на фоне эритроцитоза и увеличении содержания повышеностойких эритроцитов свидетельствует о вовлечении кортизола в стимуляцию эритропоэза.

4. Укорочение времени гемолиза эритроцитов у людей с ДТЗ указывает на повреждающее действие кортизола на структурное состояние мембраны эритроцитов.

5. Выявленный лимфоцитоз свидетельствует о вовлечении коры надпочечников в тиреотоксический синдром, при этом не обнаружено подавляющего эффекта гормона кортизола на эозинофилы крови.

6. На основании полученных данных построена схема взаимосвязи исследуемых показателей при патологии «Диффузно-токсический зоб».

Список использованных источников

1. Литвицкий, П. Ф. Патология эндокринной системы: этиология и патогенез эндокринопатий. Расстройства гипоталамо-гипофизарной системы / П. Ф. Литвицкий – Москва: Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, 2011 – С.47-55.
2. Nicolaidis, N. C. Stress, the stress system and the role of glucocorticoids / N. C. Nicolaidis (eds) / Charmandari, 2015 – С.6-19.
3. Smith, Sean M. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress / Sean M. Smith, Wylie W. Vale – USA – La Jolla: Clayton Foundation Laboratories for Peptide Biology – Calif : The Salk Institute for Biological Studies, 2006 – С.8
4. Старкова, Н. Т. Клиническая эндокринология / Н. Т. Старкова – 3-е издание переработанное и дополненное – Санкт-Петербург – 2002. – Т. 1. – 576 с.
5. Ермакова, И. В. Современные представления о механизмах регуляции функции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы / И. В. Ермакова – Москва – ФГБНУ «Институт возрастной физиологии Российской академии образования» – 2014 – С.6
6. Энциклопедия экономиста [электронный ресурс] : многопредмет. проект – Электрон. журн. – Режим доступа – <http://www.grandars.ru>.
7. Панин, Л. Е. Основы многоуровневой мезомеханики наноструктурных переходов в мембранах эритроцитов и их разрушения при взаимодействии с гормонами стресса / Л. Е. Панин [и др.] – Новосибирск : Научно-исследовательский институт биохимии СО РАМН – Томск : Институт физики прочности и материаловедения СО РАН – пос. Кольцово : ФГУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» – 2011 – С.8-15.

8. Wisegeek [электронный ресурс] : Многопредмет. журн. – электрон. журн. – Режим доступа – <https://www.wisegeek.com>.
9. Malenka, R. C. Chapter 10: Neural and Neuroendocrine Control of the Internal Milieu / R. C. Malenka [et all] // Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience, 2009 – C.9
10. Selye, H. Stress without distress / H. Selye – Philadelphia : Lippincott – 1974 – C.165
11. Backhaus, J. Sleep disturbances are correlated with decreased morning awakening salivary cortisol / J. Backhaus, K. Junghanns, F. Hohagen // Psychoneuroendocrinology, 2004 – C.9
12. Pariante, C. M. Depression, stress and the adrenal axis / C. M. Pariante // Journal of Neuroendocrinology, 2003 – C.8
13. Marques-Deak, A. Brain-immune interactions and disease susceptibility / A. Marques-Deak, G. Cizza, E. Sternberg // Molecular Psychiatry, 2005 – C.10
14. Taves, M. D. Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function / M. D. Taves, C. E. Gomez-Sanchez, K. K. Soma // American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism, 2011 – C.14
15. Chyun, Y. S. Cortisol decreases bone formation by inhibiting periosteal cell proliferation / Y. S. Chyun, B. E. Kream, L. G. Raisz // Endocrinology, 1984.
16. Coderre, L. Role of glucocorticoid in the regulation of glycogen metabolism in skeletal muscle / L. Coderre, A. K. Srivastava, J. L. Chiasson // The American Journal of Physiology, 1991 – C.16
17. Macfarlane, D. P. Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome / D. P. Macfarlane, S. Forbes, B. R. Walker // The Journal of Endocrinology, 2008 – C.14

18. Ястребова, А. П. Патофизиология нейроэндокринной системы: учебное пособие / А. П. Ястребова – Екатеринбург : УГМУ, 2018. – С.112
19. Kuo, T. Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids / T. Kuo (eds.) // *Glucocorticoid Signaling: From Molecules to Mice to Man – Advances in Experimental Medicine and Biology* – 2015 – С.99-126
20. You and your hormones [электронный ресурс] : сайт – Режим доступа – <https://www.yourhormones.info/hormones/cortisol.aspx>.
21. Perfect Keto Blog [электронный ресурс] : блог – электронный блог – Режим доступа – <https://perfectketo.com>.
22. Adrenalfatigue [электронный ресурс] : Многопредмет. журн. – Электрон. журн. – Режим доступа – <https://adrenalfatigue.org>.
23. Sakalauskiene, Jurgina Peripheral Blood Leukocytes Interleukin - 1 β Cytokine Hyper-Reactivity in Chronic Periodontitis / Jurgina Sakalauskiene, Dalia Giedrimiene, Darius Gleiznys, Alvydas Gleiznys, Rymante Gleizniene, Astra Vitkauskiene – U.S.A. : Department of Dental and Maxillofacial Orthopedics, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, School of Health and Natural Sciences and School of Pharmacy, University of Saint Joseph, Department of Radiology, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, 2016.
24. Faizuddin, M. Estimation of interleukin-1beta levels in the gingival crevicular fluid in health and in inflammatory periodontal disease / M. Faizuddin, S. H. Bharathi, N. V. Rohini // *J Periodontal Res*, 2003.
25. Sutton, Caroline E. Interleukin-1 and IL-23 Induce Innate IL-17 Production from $\gamma\delta$ T Cells, Amplifying Th17 Responses and Autoimmunity / Caroline E. Sutton [et al] // *Immunity*, 2009 – С.331-341.
26. Abderrazak, A. NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases / A. Abderrazak [et

all] // Redox Biology, 2015 – C. 296-307.

27. Banks, W. A. Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier / W. A. Banks, A. J. Kastin, E. G. Gutierrez // Neuroscience Letters, 1994 – C.53-56

28. Bastard, J. P. Evidence for a Link Between Adipose Tissue Interleukin-6 Content and Serum C-Reactive Protein Concentrations in Obese Subjects / J. P. Bastard (eds) // Circulation, 1999 – C.19

29. Benedict, C. Enhancing influence of intranasal interleukin-6 on slow-wave activity and memory consolidation during sleep / C. Benedict (eds) // FASEB Journal, 2009.

30. Pedersen, B. K. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6 // B. K. Pedersen, M. A. Febbraio // Physiological Reviews, 2008 – C.4

31. Bruunsgaard, H. Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage / H. Bruunsgaard (eds) // The Journal of Physiology, 1997 – C.499

32. News-medical [электронный ресурс] : Многопредмет. журн. – Электрон. журн. – Режим доступа – <https://www.news-medical.net/health/What-is-Interleukin-6.aspx>.

33. Angelo, D'Alessandro Red blood cell proteomics update: is there more to discover? / D'Alessandro Angelo // Blood Transfusion, 2017 – C.182-187

34. Sackmann, Erich Biological Membranes Architecture and Function / Erich Sackmann, R. Lipowsky, E. Sackmann – Handbook of Biological Physics – Elsevier, 1995 – C.62

35. Mohandas, N. Red cell membrane: past, present, and future / N. Mohandas, P. G. Gallagher // Blood, 2008 – C.11

36. Blom, J. A. *Monitoring of Respiration and Circulation* / J. A. Blom // CRC Press, 2003 – С.188

37. Snyder, Gregory K., Sheafor, Brandon A. *Red Blood Cells: Centerpiece in the Evolution of the Vertebrate Circulatory System* / Gregory K. Snyder, Brandon A. Sheafor // *Integrative and Comparative Biology*, 1999.

38. Gulliver, G. *On the size and shape of red corpuscles of the blood of vertebrates, with drawings of them to a uniform scale, and extended and revised tables of measurements* / G Gulliver // *Proceedings of the Zoological Society of London*, 1975.

39. Goodman, S. R. *The human red blood cell proteome and interactome* / S. R Goodman, A. Kurdia, L. Ammann, D. Kakhniashvili, O. Daescu // *Experimental Biology and Medicine*, 2007 – С.11

40. ThoughtCo [электронный ресурс] : Многопредмет. журн. – Электрон. журн. – Режим доступа – <https://www.thoughtco.com>.

41. Yazdanbakhsh, K. *Blood groups and diseases associated with inherited abnormalities of the red blood cell membrane* / K. Yazdanbakhsh, C. Lomas-Francis, M. E. Reid // *Transfusion Medicine Reviews*, 2000 – С.14

42. Шевцов, В. И. *Применение метода эритрограмм для изучения процесса кроветворения в условиях индукции костеобразования и миелогенеза* / В. И. Шевцов, Ю. М. Ирьянов, Н. В. Петровская // *Гений ортопедии*, 2000 – С.5

43. Maton, D. *Human Biology and Health* / D. Maton [ed all] – Englewood Cliffs, New Jersey, US : Prentice Hall – 1997 – ISBN 0-13-981176-1.

44. Janeway, C *Immunobiology* / C. Janeway, P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik (5th ed.) // New York and London : Garland Science, 2001 – С.134

45. Abbas, A. K. *Cellular and Molecular Immunology* / A. K. Abbas, A.

H. Lichtman (5th ed.) – Saunders, Philadelphia, 2003 – С.32

46. Britannica [электронный ресурс] : Многопредмет. энцикл. – Электрон. энцикл. – Режим доступа – <https://www.britannica.com>.

47. Engvall, E. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa / E Engvall // The Journal of Immunology, 1972.

48. Crowther, J. R. Chapter 2: Basic Principles of ELISA" ELISA: Theory and Practice / J. R. Crowther // Methods in Molecular Biology, 1995.

49. Britannica [электронный ресурс] : Многопредмет. энцикл. – Электрон. энцикл. – Режим доступа – <https://www.britannica.com>.

50. Schmidt, S. D. A β measurement by enzyme-linked immunosorbent assay / S. D. Schmidt, M. J. Mazzella, R. A. Nixon, P. M. Mathews // Methods in Molecular Biology, 2012 – С.27

51. Abcam [электронный ресурс]: анализ антител [сайт] – Режим доступа – <https://www.abcam.com>.

52. Yalow, Rosalyn S. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man / Rosalyn S. Yalow, Solomon A. Berson // The Journal of Clinical Investigation, 1960 – С.75

53. Lequin, R. M. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) / R. M. Lequin // Clinical Chemistry, 2005.

54. Sino Biological [электронный ресурс] : Многопредмет. журн. – Электрон. журн. – Режим доступа – <https://www.sinobiological.com>.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель магистерской
программы

 Е.И. Шишацкая

«__» _____ 2020 г.

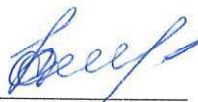
МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Механизмы и последствия активации гипоталамо-гипофизарной системы в
условиях патологии

06.04.01 - Биология

06.04.01.05 – Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель



подпись, дата

доцент, к.б.н.

должность, ученая степень

Ф.А. Гершкорон

Выпускник



подпись, дата

доцент, к.м.н.

должность, ученая степень

А.В. Попкова

Рецензент



подпись, дата

доцент, к.м.н.

должность, ученая степень

Т.В. Толмачева

Красноярск 2020