

УДК: 577.27: [615.811:612.112]

СИНТЕЗ ИНТЕРЛЕЙКИНА-8 И РЕАКЦИЯ БЛАСТНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ, СТИМУЛИРОВАННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫМ МИТОГЕНОМ И АНТИГЕНАМИ КОЛЬЦЕЦОВ

¹ПРИЛУЦКИЙ А.С., ²ФРОЛОВ А.К., ¹ЛЕСНИЧЕНКО Д.А.,
²ЛИТВИНЕНКО Р.А., ²ФЕДОТОВ Е.Р.

¹Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького,
²Запорожский национальный университет

Современное развитие профилактических и лечебных направлений в медицине диктует необходимость новых подходов к терапевтическому воздействию на организм человека. При этом приоритетными могут являться натуротерапевтические мероприятия, способные минимизировать побочные эффекты, в сравнении с синтетическими лекарственными средствами [1]. Одним из выше указанных методов является гирудотерапия (ГТ), которая в настоящее время пользуется большим успехом среди населения благодаря её лечебно-профилактической эффективности [2]. Считается, что большинство терапевтических эффектов ГТ опосредуются через иммунную систему организма [3]. Однако иммуностропность биологически активных веществ (БАВ) медицинской пиявки (МП), количество которых по данным электрофорезам более ста [4], только начинает изучаться [5]. При этом совершенно не изучена антигенная (АГ) активность БАВ слюны и тканей МП, способность их комплекса стимулировать синтез интерлейкина-8 (ИЛ-8). Среди видов МП сейчас выделяют 3: *Hirudo verbana*, *H. medicinalis*; *H. orientalis* [6]. Ранее они относились исследователями к разным таксономическим категориям [4].

В связи с выше изложенным целью нашей работы являлось изучение влияния комплекса антигенов аптечной (*Hirudo verbana*, Carena, 1820), медицинской/украинской (*H. medicinalis*, Linnaeus, 1758) и восточной (*H. orientalis*, S. Utevsy et Trontelj, 2005) медицинской пиявки, а также антигенов общего с ними представителя класса кольчатых червей — красного калифорнийского червя (ККЧ, *Eisenia fetida*, Savigny 1826) на синтез одного из ключевого хемокина — интерлейкина-8 (ИЛ-8) и реакцию бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ) в культуре мононуклеаров крови доноров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовались лимфоциты 14 женщин доноров (средний возраст 29,2±2,97 лет), которым никогда в жизни не назначали ГТ, а возможные укусы диких форм МП при купании они отрицали.

Кровь для исследования брали из вены, стабилизировали раствором кристаллического гепарина (0,2 мг/мл, Спофа). Из сепарированных на фиколл-верографиневом градиенте плотности ($\rho = 1,077$) лимфоцитов, после их отмывания забуференным раствором Хенкса [7], получали суспензию в концентрации 2 млн/мл на питательной смеси состава: среда 199, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 0,3 мг/мл глутамина, 0,15 мг/мл аспарагина, 20 мМ HEPES, 10 мМ 2-меркаптоэтанола, 100 мкг/мл гентамицина. Суспензию вносили по 250 мкл в круглодонные микропробирки объемом 2 мл, которые распределяли на следующие виды культур клеток: 1 — контроль, 2 — добавление 20 мкг/мл ФГА-М (Болгария), 3, 4, 5, 6 — соответственно добавление АГ (125 мкг/мл в пересчете на белок) из солевой вытяжки трёх видов МП (аптечной, украинской, восточной) и ККЧ. Солевой экстракт тканевых антигенов с тел кольцецов получали согласно методу [8] с последующей стерилизацией путем пропускания через бактериальный фильтр с диаметром пор 0,23 мкм (Sinpor) и хранением при -20°С до использования. Количество белка в экстракте определяли по Лоури. Данные показатели использовали для расчета доз антигенов кольцецов при культивировании мононуклеаров. Лимфоциты культивировали 24 часа при температуре 37 °С. Из осадка культуры клеток готовили мазки, фиксировали метанолом, окрашивали по Паппенгейму с дифференцировкой в подкисленной соляной кислотой дистиллированной воде. РБТЛ оценивали морфологическим методом, при анализе 400 – 600 лимфоцитов начиная от начала «щетки» до основания препарата. Учитывали малые, средние, большие бласты и лимфоциты с признаками апоптоза и некроза.

Культуральный супернатант мононуклеарных клеток отбирали в микропробирки и хранили при -20°С для определения ИЛ-8 с использованием набора реактивов для количественного определения содержания ИЛ-8 в плазме крови методом твердофазного иммуноферментного анализа производства ООО «УкрмедДон», г. Донецк, согласно стандартизированной методике,

представленной производителем, на автоматическом анализаторе «Chemwell-2910» (Awarenes Tech., США).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы «MedStat». Проверку данных на нормальность распределения осуществляли с использованием одновыборочного теста Колмогорова-Смирнова. Учитывая непараметрическое распределение рядов, для оценки различий между зависимыми выборками использовали непараметрический критерий Вилкоксона (Wilcoxon test), при этом данные были представлены в виде $Me \pm m$ (Q1; Q3), где Me — медиана, m — ошибка медианы, Q1 и Q3 — 1 и 3 квартиль. Достоверными считали различия результатов при $P > 95\%$, $p < 0,05$ [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уровни синтеза интрелейкина-8 мононуклеарами под влиянием растительного митогена и АГ кольцецов представлены в таблице 1. Установлено, что концентрация исследуемого хемокина в стимулированных культурах значительно превышает его спонтанное значение, что свидетельствует о функциональной активности мононуклеаров. Исключение составляла только культура лимфоцитов, стимулированная АГ ККЧ, которая практически по уровню синтеза в ней ИЛ-8 не отличалась ($p > 0,05$) от значений контроля. Следует отметить, что значения уровней ИЛ-8 в культурах клеток, стимулированных АГ МП, оказались достоверно ($p < 0,05$) ниже таковых в культурах, стимулированных ФГА. Вместе с тем необходимо указать на достаточно высокую активность на синтез хемокина всех антигенных комплексов МП, у которых значения верхнего квартиля Q3 практически не отличались от квартиля Q1 результатов стимуляции ФГА.

В таблице 2 приведены данные реакции бластной трансформации мононуклеаров исследованных здоровых женщин. Количество спонтанно стимулированных лимфоцитов в контрольных культурах клеток в среднем составляло $6,0 \pm 2,40\%$ с индивидуальными колебаниями от 1,6 до 10,0%, что было обусловлено разным состоянием в организме обследованных исходной активации лимфоцитов, которые завершали её в условиях культуры. Уровень РБТЛ на ФГА совпал с данными других авторов [10] и равнялся в среднем $73,75 \pm 4,40\%$, что свидетельствует о стандартности условий культивирования и достаточно хорошем состоянии здоровья обследованных доноров.

РБТЛ на АГ кольцецов превосходила, как правило, её спонтанный уровень, но в большинстве была значительно ниже, чем на растительные лектины. Превышение РБТЛ выше спонтанного уровня, также указывает на их поликлональную активацию, как и на используе-

мый нами растительный митоген. Так, РБТЛ на АГ аптечного и украинского вида МП составляла в среднем ($11,90 \pm 3,20$ и $10,60 \pm 3,10\%$, $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем). При этом индивидуальные колебания показателей РБТЛ для украинской МП были выше (6,2-31,5%), чем у аптечной (5,0-20,5%). Стимуляция лимфоцитов АГ восточного вида МП была ещё выше — $14,75 \pm 3,50\%$ при вариациях от 10,5 до 45,0% ($p < 0,05$ от контроля и с РБТЛ с АГ аптечного и украинского видов). РБТЛ на АГ ККЧ приближалась к таковой для растительных поликлональных митогенов — ФГА и в среднем составляла $47,75 \pm 5,00\%$ при индивидуальных колебаниях от 25,0 до 82,0% и более, что контрастно их отличает от показателей РБТЛ на АГ МП. Следует отметить, что доноры не имели предварительного контакта с МП, поэтому у них отсутствовала сенсibilизация по вторичному типу, то есть «клетки памяти» к АГ МП.

Нами обнаружены морфологические отличия РБТЛ на растительные лектины и АГ кольцецов. При стимуляции ФГА наблюдались типичные бласты, которые свидетельствуют о продуктивном лимфогенезе. При стимуляции АГ кольцецов бласты имели недостаточно развитую цитоплазму, снижение её базофильности, как результат недостаточности развития белок-синтетической системы, в частности гранулярного эндоплазматического ретикулума. В культурах с АГ МП значительная часть (3-8%) стимулированных лимфоцитов имели морфологические признаки апоптоза: цитопикноз, кариопикноз, кариорексис, протрузию ядра, вакуолизацию ядра и цитоплазмы, цейозис плазмолеммы. В таких культурах также часто встречались некротические лимфоциты в виде диффузных эозиновых пятен. Признаки апоптоза и некроза были особенно выражены в культурах лимфоцитов с АГ ККЧ, в которых часто превышали большую часть стимулированных клеток.

Индукция непродуктивного иммуногенеза АГ кольцецов, приводящая к апоптозу и некрозу лимфоцитов в культуре клеток для АГ МП *in vivo* в условиях ГТ, вероятно, является ведущим механизмом противовоспалительного действия БАВ слюны МП. Последние в виде антиэнзимного комплекса выделены среди БАВ МП [4]. Вместе с тем увеличение уровня РБТЛ и синтеза хемокина ИЛ-8 выше спонтанного под влиянием АГ кольцецов у доноров, в анамнезе которых отсутствует контакт с ними, можно объяснить наличием общих паттернов в структурной организации всех видов Царств органического Мира: Дробянок, Растений, Грибов, Животных. По современным представлениям структурные паттерны [11, 12] представляют собой филогенетически стабильные, ограниченные 8 – 10 – 20 мономерами последовательности биополимеров (ФСРБ), сход-

ные у представителей разных филогенетических групп. Видовое разнообразие молекулярных паттернов также ограничено — около 20 [13].

За различие молекулярных паттернов (ФСБ) ответственны специфические паттерно-распознающие рецепторы (ПРР), которые имеются на большинстве компартментов клетки (плазмолемные и цитоплазматические), преимущественно на клетках врожденного иммунитета и в меньшей мере на лимфоцитах [11]. ПРР находят и в других клетках различных тканей. В настоящее время подробно изучена роль взаимодействия ФСБ-ПРР в противоинфекционной защите [14] и иммунопатологии по типу аллергии и аутоаллергии [15, 16]. Естественно эти взаимодействия принимают участие и в регуляции онтогенеза и регенерации, на что указывает факт первого открытия одного из видов ПРР — Toll-подобных рецепторов (TLR) при изучении аномального эмбриогенеза дрозофилы [17].

Обнаруженные количественные различия РБТЛ под влиянием АГ кольцецов можно объяснить следующим образом: ККЧ обитает в почве, питается гумусом, растительными остатками, насыщенными разнообразными микроорганизмами. От их защиты и для регуляции онтогенеза данный вид имеет разнообразие ФСБ и ПРР к ним. Это обеспечивает их эффективную физио-

логическую и репаративную регенерацию, сильный иммунитет. Так, спонтанный уровень естественных лизин-гемагглютининов у дождевого червя (дикие формы ККЧ) составляет 1 : 3920 [18]. Поэтому АГ ККЧ в культуре проявляют сильный апоптотический и некротический эффект.

МП питается относительно стерильной пищей (тканевая жидкость, кровь) водных и наземных позвоночных. Среди наземных позвоночных основными хозяевами-прокормителями являлись пойменные копытные животные. Облигатный паразитизм МП филогенетически эволюционировал в мутуалистические взаимоотношения, в ходе которых патогенные ФСБ отсекались отбором, что и привело к умеренной индукции апоптоза и противовоспалительного эффекта. Можно считать, что аптечная и украинская МП имеют более раннее филогенетическое взаимодействие с позвоночными, чем их восточная разновидность, на что указывает достоверно большие апоптотические и некротические эффекты АГ этого вида по сравнению с первыми.

Сравнительный анализ полученных результатов РБТЛ и синтеза ИЛ-8 позволил объяснить их взаимосвязь. Так, низкие значения ИЛ-8 в культурах лимфоцитов, стимулированных АГ ККЧ, являются следствием выраженной цитотоксичности.

Таблица 1

Уровни спонтанной и митоген/антиген-стимулированной продукции интерлейкина-8 в культуре мононуклеаров доноров (n=14), пг/мл (Wilcoxon test)

№ группы	Продукция ИЛ-8 мононуклеарами крови:	Me±m	Q1	Q3
1	Спонтанная	357,3±113,2	151,2	773,8
2	Стимулированная ФГА	25732,0±3988,0*	15783,0	37079,0
3	Стимулированная АГ аптечной пиявки	4078,6±2658,0**	1621,4	16705,6
4	Стимулированная АГ украинской пиявки	4051,6±2421,0**	1982,1	11375,1
5	Стимулированная АГ восточной пиявки	10187,5±2098,0**	1467,0	13245,5
6	Стимулированная АГ красного калифорнийского червя	428,4±137,7***	210,8	905,8

Примечание: * — p<0,05 в сравнении с группой 1; ** — p<0,05 в сравнении с группами 1,2; *** — p<0,05 в сравнении с группами 2,3,4,5.

Таблица 2

Показатели реакции бластной трансформации лимфоцитов крови доноров (n=14) на растительный лектин и антигены кольцецов (Wilcoxon test)

№ группы	РБТЛ	%±ош.доли	Q1	Q3
1	Спонтанная	6,00±2,40	3,88	7,63
2	Стимулированная ФГА	73,75±4,40*	66,50	78,25
3	Стимулированная АГ аптечной пиявки	11,90±3,20**	8,15	15,75
4	Стимулированная АГ украинской пиявки	10,60±3,10**	8,50	13,35
5	Стимулированная АГ восточной пиявки	14,75±3,50***	12,15	19,00
6	Стимулированная АГ красного калифорнийского червя	47,75±5,00‡	31,00	78,88

Примечание: * — p<0,05 в сравнении с группой 1; ** — p<0,05 в сравнении с группами 1,2; *** — p<0,05 в сравнении с группами 1,2,3,4; ‡ — p<0,05 в сравнении с группами 1,2,3,4,5.

ВЫВОДЫ

1. В супернатантах культур лимфоцитов, содержание ИЛ-8 и уровни РБТЛ были выше при стимуляции мононуклеаров ФГА, по сравнению с таковой на АГ МП.
2. РБТЛ доноров в митоген-стимулированных культурах развивалась по типичному стереотипу продуктивного иммуногенеза, тогда как в культурах с АГ кольцецов — по непродуктивному типу, переходящему в апоптоз и некроз, который максимально проявлялся в культурах с АГ ККЧ.

ЛИТЕРАТУРА

1. До питання класифікації побічних реакцій лікарських засобів та підходів до їх диференціації (бібліографічний огляд) / О. В. Матвеева, О. П. Вікторов, В. Є. Бліхар [та ін.] // Укр. мед. часопис. — 2011. — № 2 (82). — С. 78-84.
2. Сухов К. В. Фундаментальные вопросы гирудотерапии: лечение медицинскими пиявками и теория общей патологии / В. К. Сухов // Первый Всемирный конгресс гирудотерапии: тезисы докладов. Москва, 24-25 сентября 2013 г. Под ред. К. В. Сухова. — М.: Norwell Partners Inc., 2013. — С. 8-11.
3. Вплив біологічно активних речовин медичної п'явки на ізольовані зразки крові під час гірудотерапії / О. К. Фролов, В. В. Копійка, Є. Р. Федотов, Р. О. Литвиненко // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. — 2010. — № 3 (51). — С. 36-40.
4. Каменев О. Ю. Лечение пиявками: теория и практика гирудотерапии: руководство для врачей / О. Ю. Каменев, А. Ю. Барановский. — СПб.: ИГ «Весь», 2006. — 304 с.
5. Баскова И. П. Гирудотерапия. Наука и практика / И. П. Баскова, Г. С. Исаханян. — М., 2004. — 508 с.
6. Chromosome numbers for three species of medicinal leeches (*Hirudo* spp.) / S. Utevsky, N. Kovalenko, K. Doroshenko [et al.] // Syst. Parasitol. — 2009. — Vol. 74. — P. 95-102.
7. Лимфоциты: Методы; пер. с англ. / под ред. Дж. Клауса. — М.: Мир, 1990. — 395 с.
8. Пат. 80665 Україна, (51) МПК (2013.01), А61К 38/00 А61К 39/00. Спосіб отримання антигенів із медичної п'явки / Фролов О. К., Литвиненко Р. О., Копійка В. В., Федотов Є. Р.; власник Державний вищий

- навчальний заклад «Запорізький національний університет» Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України. — № у 2012 13751; заявл. 03.12.2012; опубл. 10.06.2013, Бюл. № 11.
9. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц; пер. с англ. — М.: Практика, 1999. — 459 с.
 10. Назаренко Г. И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований / Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. — М.: Медицина, 2000. — 544 с.
 11. Лебедев К. А. Иммунология образраспознающих рецепторов: Интегральная иммунология / К. А. Лебедев, И. Д. Понякина; изд. 2. — М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2013. — 256 с.
 12. Хаитов Р. М. Роль паттернраспознающих рецепторов во врожденном и адаптивном иммунитете / Р. М. Хаитов, М. В. Пашенков, Б. В. Пинегин // Иммунология. — 2009. — № 1. — С. 66-76.
 13. Дранник Г. Н. Клиническая иммунология и аллергология: пособие / Г. Н. Дранник, А. Г. Дранник; 5-е изд., доп. — К.: Полиграфплюс, 2011. — 561 с.
 14. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response / R. Medzhitov // Nature. — 2007. — Vol. 449. — P. 819-826.
 15. Полиморфизм гена Toll-like рецептора 4 ASP299GLY у больных ревматоидным артритом / К. В. Белоглазова, О. А. Шлыкова, О. В. Измайлова, И. П. Кайдашев // Проблемы экологии та медицини. — 2009. — Т. 13, № 5-6. — С. 15-17.
 16. Генетичний поліморфізм Toll-подібного рецептора 4 у дітей з atopічною бронхіальною астмою / Т. О. Крючко, І. П. Кайдашев, Ю. О. Вовк [та ін.] // Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология. — 2011. — № 5. — С. 52-54.
 17. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults / B. Lemaire, E. Nicolas, L. Michaut [et al.] // Cell. — 1996. — Vol. 86. — P. 973-983.
 18. Купер Э. Сравнительная иммунология / Э. Купер; пер. с англ., под ред. Н. Г. Хрущова. — М.: Мир, 1980. — 422 с.

РЕЗЮМЕ

**СИНТЕЗ ІНТЕРЛЕЙКІНУ-8 І РЕАКЦІЯ БЛАСТНОЇ
ТРАНСФОРМАЦІЇ ЛІМФОЦИТІВ, СТИМУЛЬОВАНА
РОСЛИННИМ МІТОГЕНОМ ТА АНТИГЕНАМИ
КІЛЬЦЕЦІВ**

¹Прилуцький О.С., ²Фролов О.К., ¹Лесніченко Д.О., ²Литвиненко Р.О., ²Федотов Є.Р.

¹Донецький національний медичний університет імені М. Горького, Донецьк, Україна

²Запорізький національний університет, Запоріжжя, Україна

У культурі мононуклеарів 14 жінок (середній вік 29,2±2,97 років), що не мали контакту з медичною п'явкою (МП), вивчені рівні інтерлейкіну-8 (ІЛ-8) і реакція бластної трансформації лімфоцитів (РБТЛ) на рослинний мітоген (ФГА) і антигени (АГ) сольового екстракту кільцеців (*Hirudo verbana*, *H. medicinalis*, *H. orientalis*, *Eisenia fetida*). В супернатантах культур лімфоцитів, стимульованих АГ МП синтез ІЛ-8, був нижче, ніж при активації рослинним мітогеном. Рівень РБТЛ був вище при стимуляції мононуклеарів ФГА, у порівнянні з такою на АГ МП. РБТЛ донорів у мітоген-стимульованій культурі розвивалася за типовим стереотипом продуктивного імуногенезу, тоді як у культурах з АГ кільцеців — по непродуктивному типу, що переходив у апоптоз і некроз, який максимально проявлявся в культурах з АГ *Eisenia fetida*.

Ключові слова: реакція бластної трансформації лімфоцитів, медична п'явка, антигени, мітогени, інтерлейкін-8

SUMMARY

Synthesis of interleukin-8 and reaction of lymphocytes blast transformation stimulated plant mitogen and annelids antigens

¹Prilutsky A.S., ²Frolov A.K., ¹Lesnichenko D.A., ²Litvinenko R.A., ²Fedotov E.R.

¹Donetsk National Medical University of Maxim Gorky, Donetsk, Ukraine

²Zaporizhzhya National University, Zaporizhzhia, Ukraine

In the mononuclear culture of 14 women (mean age 29,2±2,97 years) who have never had a contact with the medical leech (ML), we studied the levels of interleukin-8 (IL-8) and the reaction of lymphocytes' blast transformation (BTR test) on plant mitogen (PHA) and antigens (AG) from annelids saline extract (*Hirudo verbana*, *H. medicinalis*, *H. orientalis*, *Eisenia fetida*). In the supernatants of lymphocyte cultures stimulated AG ML synthesis IL-8, was lower than the activation plant mitogens. RBTL whereas level was higher in the stimulation of mononuclear cells with PHA in comparison with such in the AG ML. BTR test donors in mitogen-stimulated culture developed on a typical stereotype productive immunogenesis, whereas in cultures with AG annelids — on unproductive type, passing into apoptosis and necrosis, which maximizes manifested in cultures with AG *Eisenia fetida*.

Key words: reaction of lymphocytes' blast transformation, medical leech, antigens, mitogen, interleukin-8

УДК 616.248-07-477.75+575.24

**С159Т ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА РЕЦЕПТОРА CD14 У ВЗРОСЛЫХ БОЛЬНЫХ С
РАННИМ И ПОЗДНИМ НАЧАЛОМ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ**

КУРЧЕНКО А.И., БИСЮК Ю.А., БЕЛОГЛАЗОВ В.А.

Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца, г. Киев.

Распространённость бронхиальной астмы (БА) в мире по данным кросс-секционного исследования [1] составляет 4,3%, с наибольшей частотой в Австралии – 21%; в Украине этот показатель составляет 2,77%.

Одним из фенотипов БА, который активно исследуется последние десятилетия, является возраст начала симптомов заболевания и обозначается как астма «раннего» и/или «позднего» начала. Существуют огромное количество подходов для дифференцирования астмы раннего или позднего начала. Астму «раннего начала» чаще связывают с IgE-зависимой реакцией, а для фенотипа «позднего начала» более характерно нейтрофильное воспаление и повышенная чувствительность к аспирину [2].

По данным недавно проведённого кластерного анализа было обнаружено, что астма раннего начала манифестируется до 40 лет и характеризуется наличием атопии и назначе-

нием более 3 контролируемых препаратов, а позднего начала чаще наблюдается у женщин после 40 лет и связана с повышенной потребностью в использовании оральных кортикостероидов [3].

Эндотоксин грамотрицательных бактерий является одним из основных индукторов и регуляторов хронического воспаления при БА [4] и оказывает своё действие посредством активации рецепторного комплекса CD14/TLR4/MD2 расположенного на поверхности моноцитов, макрофагов и нейтрофилах [5]. В процессе созревания иммунной системы эндотоксин обладает протективными свойствами по отношению к развитию атопической БА [6] путём стимуляции Т-хелперов 1 типа, но чрезмерное поступление его в организм как ингаляционно, так и путём транслокации в кишечнике может вызвать обратный эффект и привести к ухудшению течения данного заболевания [7].