

ПЕРЕМОЖЦІ ВСЕУКРАЇНСЬКОГО КОНКУРСУ СТУДЕНТСЬКИЙ НАУКОВИХ РОБІТ З БІОЛОГІЧНИХ НАУК



УДК 615.811.2: 611.018.53

ВПЛИВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН СОЛЬОВОГО ЕКСТРАКТУ МЕДИЧНОЇ П'ЯВКИ НА ФАГОЦИТАРНУ АКТИВНІСТЬ НЕЙТРОФІЛІВ І ЦИТОМОРФОМЕТРИЧНІ ЗМІНИ ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ ЛЮДИНИ У КУЛЬТУРІ

Р. Ф. АМІНОВ, О. К. ФРОЛОВ

Запорізький національний університет, Україна,
69600, м. Запоріжжя, вул. Жуковського, 66
e-mail: 91_amin_91@mail.ru, a_frolov@ukr.net

Досліджена культура клітин крові десяти донорів, чоловічої статі, зрілого віку, в якій, *in vitro* вивчено імунологічну реактивність нейтрофілів і лімфоцитів на пекарські дріжджі на фоні різної концентрації біологічно активних речовин сольового екстракту із тіл медичної п'явки для визначення оптимальних імуногенних концентрацій. В результаті експериментальних досліджень у донорів при дії різної концентрації антигенів медичної п'явки було виявлено, що в короткостроковій культурі лейкоцитів на 30 і 90 хвилинній інкубації малі і середні концентрації антигенів стимулювали фагоцитарну активність нейтрофілів, а великі пригнічували, в тому числі і їх перетравлюючу здатність. Лімфоцити крові реагували на малі (20 мкг / мл) і середні (40 - 80 мкг / мл) концентрації антигенів медичної п'явки і дріжджі апоптичними і продуктивними імунологічними реакціями, які проявлялись зменшенням малих лімфоцитів зі збільшенням середніх лімфоцитів – це демонстрація продуктивного імуногенезу перехід частини малих в середні після антигенної - активації і початкової реакції бластної трансформації лімфоцитів. Великі концентрації антигенів медичної п'явки (120 - 250 мкг / мл) індукували на лімфоцити апоптичними і цитотоксичними реакціям, які проявлялись різким збільшенням малих лімфоцитів за рахунок зменшення середніх лімфоцитів. В частині культури без робочого розчину дріжджів при дозі 120 мкг/мл антигенів медичної п'явки, яку культивували 24 години, мононуклеари відрізнялися пікнотичними малими і великими лімфоцитами з ознаками апоптозу. Збереження продуктивного імуногенезу лімфоцитів ймовірно забезпечується цитокиновою підтримкою, яка реалізується при фагоцитарній реакції мікрофагів та макрофагів. Були отримані оптимальні дози для фагоцитарної реакції нейтрофілів і реактивності лімфоцитів, починаючи з концентрації 20 мкг / мл і закінчуючи кінцевою концентрацією 80 мкг / мл. Концентрації доз 120 – 250 мкг / мл є цитотоксичними. Визначенні *in vitro* межі концентрацій антигенів медичної п'явки дозволять регламентувати об'єм гірудотерапії по сучасному принципу доказової медицини. Вперше встановлено явище індукції апоптозу в імунокомпетентних клітинах крові людини під впливом біологічно активних речовин медичної п'явки. Може пояснювати механізм протизапальної дії гірудотерапії. Крім того відкриває перспективу для подальшого вивчення цього явища на рівні організму і з подальшою можливістю купірувати алергічні і аутоімунні захворювання шляхом наведення через апоптоз імунологічної толерантності на алергени.

Ключові слова: гірудотерапія, біологічно активні речовини, медична п'явка, лейкоцити, фагоцитоз, цитоморфометрія, реакція бластної трансформації лімфоцитів.

Вступ. В останній час на тлі наростаючої алергізації населення, зростання числа ускладнень і побічних ефектів фармакотерапії, відзначається активний пошук можливостей застосування різних не медикаментозних методів впливу на організм людини. Особливу увагу привертають методи, які тисячоліття успішно застосовувалися нашими предками (Каменев и Барановский, 2006). Один з таких методів - гірудотерапія (ГТ) - використання медичних п'явок у лікувальних цілях (Басков и Исаханян,

2004; Савинова, 2004). Основою лікувального ефекту гірудотерапії є слина п'явки, яка містить велику кількість біологічно активних речовин (БАР), що сприяють нормалізації внутрішнього гомеостазу (Геращенко и Никонов, 2007). Разом зі слиною вона вводить в організм людини понад 150 біологічно активних ферментів. Чимало з них має білкову природу, тому стає об'єктом реакції імунної системи людини, зміни якої й зумовлюють більшість терапевтичних ефектів ГТ (Башкирцева, 2008). Вплив БАР

вивчено недостатньо, а імунологічна дія БАР тільки почала вивчатись (Фролов та ін., 2010). Одна з причин цих недоліків полягає в нестачі об'єктивних методів, які характеризують функцію імунокомпетентних клітин крові людини. З таких імуногенезних методів є метод визначення фагоцитарної активності нейтрофілів і цитоморфометричний аналіз лімфоцитів, які характеризують реакції вродженого імунітету. Тому головна мета цього дослідження за допомогою цих методів вивчити індивідуальну імунологічну реактивність імунокомпетентних клітин крові людини на різні концентрації антигенів (АГ) сольового екстракту медичної п'явки (МП). Для встановлення оптимальних концентрацій АГ МП, які забезпечують фізіологічні межі фагоцитарної реакції нейтрофілів і реакції бластної трансформації лімфоцитів.

Матеріали і методи. Дослідження проводилися в навчально-науково-дослідній лабораторії клітинної та організмової біотехнології Запорізького національного університету (зав. лаб. д. м. н., професор Фролов О. К.). Досліджувалася культура клітин крові 10 донорів чоловічої статі, зрілого віку. Матеріалом для дослідження була венозна кров стабілізована гепарином, в якій визначали кількість лейкоцитів для оцінки функціонального статусу імунної системи (інтактний зразок). Далі отримували лейкоконцентрат макрометодом в 10% розчині желатину (1% / мл), визначали відсоток виходу лейкоцитів, який становив 90-95% (Фролов та ін., 2007). Готували суспензію клітин на культуральній сумішці концентрацією 4,0 млн / мл. Досліджували фагоцитарну активність нейтрофілів (фагоцитарний індекс і фагоцитарне число) і цитоморфометричні показники лімфоцитів, під впливом різної концентрації антигенів сольового екстракту із тіл МП (Фролов та ін., 2013). Дозування антигенів сольового екстракту здійснювали за вмістом білка (визначали за Лоурі). Отриману лейкомасу, в якій заздалегідь ми визначили вміст лейкоцитів, у об'ємі по 50 мкл розливали в мікропробірки і додавали відповідну дозу АГ МП. Початкова доза АГ становила 20 мкг / мл, а кінцева 250 мкг / мл суспензії лейкоцитів (20; 40; 80; 120; 250) та додавали по 50 мкл робочого 1% розчину дріжджів. Охайно перемішували. Після чого всі дослідні зразки крові крім інтактних інкубували в термостаті при +37° С протягом 90хв. Кожні 10 хв. охайно перемішували. Мазки готували на 30 та 90 хв. Частину культури без додавання робочого розчину дріжджів при дозі 120 мкг/мл АГ МП культивували 24 години. Після чого оцінювали реакцію бластної трансформації

лімфоцитів (РБТЛ) у %. Фіксували ці мазки у 96% етанолі і фарбували за Папенгеймом (комбіноване фарбування за Май-Грюнвальдом 5 хвилин та Романовським - Гімза 25 хвилин). Результати порівнювали з референтними значеннями для даного віку. Дослідні зразки з відповідним вмістом АГ МП порівнювали з контролем (без АГ). Статистичну обробку результатів проводили методом обчислення середньої арифметичної, помилки середньої арифметичної, середнього квадратичного відхилення за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Office Excel 2010. Вірогідність відмінностей між середніми величинами оцінювали за критерієм Ст'юдента. Різниці вважали достовірними при $P \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. Результати експериментальних досліджень щодо фагоцитарної активності нейтрофілів та цитоморфометричних показників лімфоцитів під дією різної концентрації АГ МП представлені в таблицях 1 та 2, відповідно. Дані культури клітин 10 донорів були усереднені так, як динаміка впливу АГ МП в різній концентрації на досліджувані показники була подібною незалежно від анамнезу. При дослідженні усереднених даних 10 донорів у фагоцитарній активності нейтрофілів (ФАН) було виявлено, що при 30 хв. інкубації фагоцитарний індекс (ФІ) в контрольній культурі (без АГ МП) знаходився в межах фізіологічних значеннях і дорівнював $60,64 \pm 1,09$ % і починав збільшуватися від концентрації 40 мкг/ мл до 250 мкг/мл. При 90 хв. інкубації ФІ продовжує зростати, як в контрольних, так і в навантажувальних тестах (табл. 1). Пригнічення ФРН нами підтверджено при аналізі фагоцитарного числа (ФЧ) - це середня кількість поглинутих дріжджів, захоплених одним нейтрофілом (табл. 1). ФЧ при 30 хв. інкубації в контрольних і дослідних значеннях культури лейкоцитів до концентрації 120 мкг / мл були в межах $3,624 \pm 0,18 - 4,77 \pm 0,24$, що відповідає їх фізіологічним значенням і тільки доза АГ МП 250 мкг / мл має місце у зменшенні ФЧ, як загальне пригнічення ФАН. В культурах клітин з додаванням АГ МП до концентрації 120 мкг / мл при 90 хв. інкубації ФЧ продовжує підвищуватися, це свідчить про пригнічення перетравлюючої здатності фагосом нейтрофілів. Ці дані співпадають з даними літератури, про наявність в МП антиферментних компонентів (антитрепсин, антипепсин). Пригнічення ФЧ в 90 хв. культурі з концентрації 250 мкг / мл, як наслідок загального пригнічення ФАН.

Таблиця 1.
Фагоцитарна активність нейтрофілів 10 донорів при 30 і 90 хв. інкубації під дією різної концентрації АГ МП

Table 1.
Phagocytic activity of neutrophils of 10 donors at 30 and 90 min. incubation under different concentrations of AG ML

Час культивування	Показник	Дози антигенів медичної п'явки					
		0	20	40	80	120	250
30 хв	ФІ	60,64 ± 1,09	59,3 ± 1,098	66,65 ± 1,054	63,96 ± 1,07	64,47 ± 1,07	69,25 ± 1,03*
	ФЧ	3,77 ± 0,18	3,86 ± 0,19	3,95 ± 0,2	3,85 ± 0,19	3,72 ± 0,18	3,29 ± 0,16
90 хв	ФІ	68,23 ± 1,04	65,97 ± 1,06	73,41 ± 0,99	70,84 ± 1,02	70,46 ± 1,02	73,35 ± 0,99
	ФЧ	3,124 ± 0,16**	4,67 ± 0,23*,**	4,766 ± 0,24*,**	4,773 ± 0,24*,**	3,859 ± 0,19*,**	2,986 ± 0,15**

Примітка: * - показники достовірно відрізняються від контролю ($p \leq 0,05$), ** - показники достовірно відрізняються 30 від 90 хв. інкубації ($p \leq 0,05$)

Note: * - significant difference as compared to control value ($p \leq 0,05$), ** - significant difference as compared between 30 and 90 min. incubation ($p \leq 0,05$)

Одночасно з фагоцитарною реакцією нейтрофілів в культурах лейкоцитів з різним вмістом АГ МП аналізували імунологічну реактивність лімфоцитів цитоморфометричним методом (табл. 2). В інтактній крові варіації малих (< 6,0 мкм), середніх (7 - 9 мкм) і великих (> 10 мкм) цитоморфометричних класів лімфоцитів (ЦКЛ) в сумі співпадали з їх кількістю у донорів даного віку. В контрольних (без АГ МП) культурах лейкоцитів відбувалися значні зміни в співвідношенні ЦКЛ: різке збільшення малих і значне зменшення великих

лімфоцитів. Згідно до концепції функціонального значення ЦКЛ розробленої Фроловим О. К.: більшість малих і великих лімфоцитів відносяться до активованих тому їх зміни є наслідком їх імунологічної реактивності. Збільшення малих ЦКЛ - є наслідком апоптичної реакції середніх і великих лімфоцитів. Малі (20 мкг / мл) і середні (40 - 80 мкг / мл) концентрації АГ МП демонстрували апоптичні і продуктивні імунологічні реакції, які проявлялись зменшенням малих ЦКЛ зі збереженням великих лімфоцитів.

Таблиця 2.
Цитоморфометричні показники лімфоцитів 10 донорів при 30 хв. інкубації під дією різної концентрації АГ МП

Table 2.
Cytomorphometric data of lymphocytes of 10 donors in 30 min. incubation under different concentrations of AG ML

Час культивування	Розмірність класів лімфоцитів, %	Дози антигенів медичної п'явки						
		інтакт	0	20	40	80	120	250
1	2	3	4	5	6	7	8	9
30 хв	Малі КЛ ≤ 6 (<6,4)	21,7 ± 1,3	43,2 ± 1,57*	35,3 ± 1,51*,**	35, ± 1,52*,**	29 ± 1,43*,**	52,4 ± 1,58*,**	59,2 ± 1,55*,**
	Середні КЛ 7-9 (6,5-9,4)	62,3 ± 1,53	41,5 ± 1,56*	54,9 ± 1,57*,**	55, ± 1,57*,**	64,2 ± 1,52*,**	38,3 ± 1,54*	33,8 ± 1,49*,**
	Великі КЛ ≥ 10 (9,5<)	16 ± 1,16	15,3 ± 1,14	9,8 ± 0,94*,**	8,8 ± 0,89*,**	6,8 ± 0,8*,**	9,3 ± 0,9*,**	7 ± 0,81*,**
	Середній діаметр лімфоцитів, мкм	7,48 ± 0,52	6,30 ± 0,44	6,66 ± 0,47	6,6 ± 0,47	6,46 ± 0,45	6,19 ± 0,43	5,83 ± 0,41*

Примітка: * - показники, що достовірно відрізняються від інтакту ($p \leq 0,05$), ** - показники, що достовірно відрізняються від контролю ($p \leq 0,05$).

Note: significant difference as compared to intact group values ($p \leq 0,05$), ** - significant difference as compared to control values ($p \leq 0,05$).

Заслугове уваги факт, що не тільки при малих і середніх концентраціях АГ МП, але і при великих концентраціях в культурі клітин зберігалась частина великих лімфоцитів. Збереження відповідного пула великих лімфоцитів свідчить про гетерогенність популяції лімфоцитів до факторів.

Для з'ясування механізму впливу АГ МП частину культури при дозі 120 мкг/мл без робочого розчину дріжджів культивували 24 години. Після чого оцінювали реакцію бластної

трансформації лімфоцитів (РБТЛ) у %. Було виявлено, що збільшується РБТЛ порівняно з контролем 11,9 ± 1,19% (при контролі 5,5±0,47%), (рис. 1). Бласти морфологічно відрізнялись від контрольних: зниження їх середнього об'єму і знижена базофілія цитоплазми за рахунок пригнічення синтезу рибосомальних РНК. А в значній частині активованих лімфоцитів спостерігалися явні ознаки апоптозу 2,4±0,8% (цитоліз і вакуолізація цитоплазми, регургітація і каріолексис ядра.

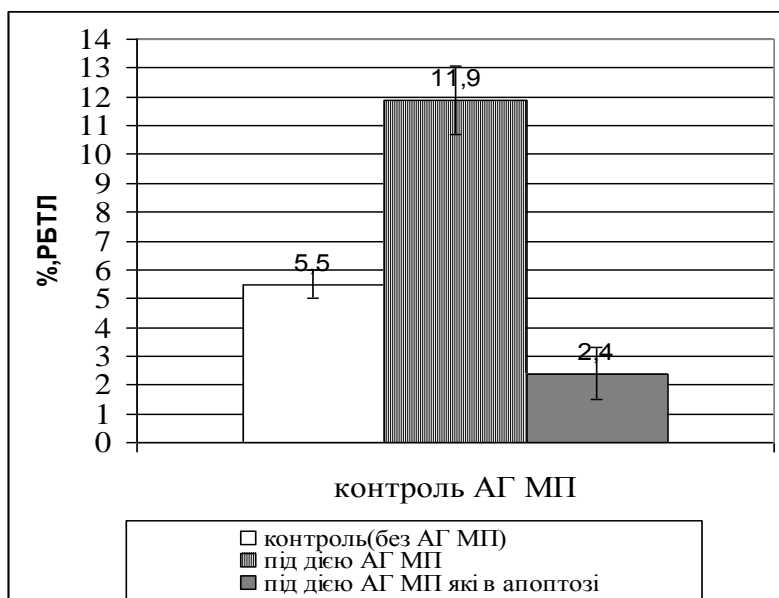


Рис. 1. Показники реакції бластної трансформації лімфоцитів крові донорів на антигени сольового екстракту медичної п'явки у дозі 120 мкг / мл, %

Fig.1. Data of reaction of lymphocytes blast transformation of in the donor blood on antigens of medicinal leech salt extract at a dose of 120 mcg / ml, %

Висновки:

1. Пролонгована постановка фагоцитарної реакції нейтрофілів і цитоморфометричний метод аналізу розмірності класів лімфоцитів є інформативними тестами, які об'єктивно відображають стан імунокомпетентних клітин на момент обстеження.
2. Збільшення рівня малих лімфоцитів в контрольній культурі і при додаванні різної концентрації антигенів медичної п'явки свідчить про переважання апоптичних реакцій над продуктивними імуногенетичними. Про рівень останніх можна судити за наявністю великих лімфоцитів (імунобластів), які зберігаються і при великих концентраціях. Збереження продуктивного імуногенезу лімфоцитів ймовірно забезпечується цитокиновою підтримкою, яка реалізується при фагоцитарній реакції мікрофагів та макрофагів.
3. Зменшення малих і збільшення середніх лімфоцитів при дозі 80 мкг / мл можна

розцінити, як імуногенетична реакція на фоні загального апоптозу.

4. Встановленні оптимальні концентрації АГ МП від 20 до 80 мкг / мл для фагоцитарної реакції нейтрофілів і реактивності лімфоцитів. Концентрації доз 120 – 250 мкг / мл є цитотоксичними.
5. Визначенні in vitro межі концентрацій АГ МП дозволять регламентувати об'єм гірудотерапії по сучасному принципу доказової медицини.
6. Вперше встановлено явище індукції апоптозу в імунокомпетентних клітинах крові людини під впливом БАР МП. Може пояснювати механізм протизапальної дії гірудотерапії. Крім того відкриває перспективу для подальшого вивчення цього явища на рівні організму і з подальшою можливістю купірувати алергічні і аутоімунні захворювання шляхом наведення через апоптоз імунологічної толерантності на алергени.

Список літератури:

1. Каменев О.Ю. Лечение пиявками: теория и практика гирудотерапии: руководство для врачей / О.Ю. Каменев, А.Ю. Барановский. – СПб.: ИГ «Весь», 2006. – 304 с.
2. Башкирцева Н. А. Лечимся пиявками / Нина Анатольевна Башкирцева. – СПб. : Крылов, 2008. – 128 с.
3. Баскова И.П. Гирудотерапия / И.П. Баскова, Г.С. Исаханян. – М.: НВП «Гируд И.Н.», 2004. – 506 с.
4. Гирудотерапия. Руководство для врачей/ под ред.. В.А. Савинова. – М. : ОАО Медицина, 2004.- 432 с.
5. Геращенко Л. Все о пиявке. Гирудотерапия для разных типов людей / Л. Геращенко. – СПб., 2007. – 250 с.
6. Фролов О. К. Основи імунології : навч. посіб. для студ. біологічного факультету денної та заочної форм навчання / О. К.Фролов В. В. Копійка, Є. Р. Федотов. – Запоріжжя: ЗНУ, 2007. – с.11- 12
7. Фролов О.К., Литвиненко Р.О., Копійка В.В., Федотов Є.Р. Спосіб отримання антигенів із медичної п'явки // Патент України № 80665. 2013. Бюл. № 11.
8. Фролов О. К. Вплив біологічно активних речовин медичної п'явки на ізольовані зразки крові під час гірудотерапії / О. К. Фролов, В. В. Копійка, Є. Р. Федотов // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2010. № 3. – с. 36-41.

References:

1. Kamenev O.Ju., Baranovskij A.Ju. Lechenie pijavkami:teorija i praktika girudoterapii : rukovodstvo dlja vrachej. St. Petersburg: IG «Ves'», 2006. 304 p.
2. Bashkirtseva N. A. Lechimsya leeching . St. Petersburg. : Krylov, 2008. –128 p.
3. Baskova I.P., Isahanjan G.S. Girudoterapija. Moscow: NVP «Girud I.N.», 2004. 506 p.
4. Savinov V.A. (Ed.). 2004. Hirudotherapy: guide.Medicina, Moscow (In Russian).
5. Gerashhenko. L. (2007) Vse o piyavke. Girudoterapiya dlya raznykh tipov lyudej [All of the leech. Leech therapy for different types of people]. Saint Petersburg [in Russian]..
6. Frolov A.K., Kopeika V.V., Fedotov E.R. Fundamentals of immunology: teach. guidances. for students. Biology Faculty full-time and distance learning. - Zaporozhye: News, 2007. - P.11-12
7. Frolov O.K., Litvinenko R.O., Kopeika V.V., Fedotov E.R. Sposib otrimannja antigeniv iz medichnoї p'javki. Patent Ukraini. No. 80665. 2013. Bjul. no. 11.
8. Frolov A.K., Kopeika V.V., Fedotov E.R. Effect of biologically active substances of medicinal leech on isolated samples of blood in the process of hirudotherapy // Experimental and clinical physiology. - 2010. № 3. - P. 36-41.

INFLUENCE OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN THE SALT EXTRACT OF THE MEDICINAL LEECH ON PHAGOCYtic ACTIVITY OF NEUTROPHILS AND CYTOMORPHOMETRIC CHANGES OF BLOOD LYMPHOCYTES IN CULTURE

R. F. Aminov, A. K. Frolov

Studied the culture of blood cells of ten male, adult donors. In which, in vitro studied the immunological reactivity of neutrophils and lymphocytes on the baker's yeast on a background of various concentrations of biologically active substances from saline extract of the medicinal leech bodies to determine the optimal immunogenic concentrations. As a result of experimental studies donors under the action of different concentrations of medicinal leech antigens was found that in the short-termed leukocyte culture for 30 and 90 min incubation of small and medium concentrations of antigens stimulated the phagocytic activity of neutrophils and large ones suppressed it, including their digesting ability. Blood lymphocytes respond to small (20 mcg / ml) and medium (40 - 80 mcg / ml) concentrations of antigens of the medicinal leech and yeast by apoptotic and productive immunological reactions that were by small lymphocytes decrease with an increase in the average lymphocytes, which is a demonstration of productive immunogenesis transition of part of small lymphocytes in medium ones after antigen activation and initial reaction of blast transformation of lymphocytes. Large concentrations of medicinal leech antigens (120 - 250 mcg / ml) induced apoptotic cells to cytotoxic reactions and that manifested sharp increase in small lymphocytes by reducing the average number of lymphocytes. At a part of the culture of the working solution without yeast at a antigens' of medicinal leech dose of 120 mcg / ml, which were cultured for 24 hours, mononuclear cells differed by pyknotic small and large lymphocytes with signs of apoptosis. Save of productive immune lymphocytes probably ensured cytokine support, implemented in phagocytic reaction of microphages and macrophages. Were obtained optimal dose for phagocytic response of neutrophils and lymphocytes reactivity, starting with a concentration of 20 mcg / ml and ending with a final concentration of 80 mcg / ml. Concentrations doses of 120 - 250 mcg / ml are cytotoxic. Finding in vitro of medicinal leech antigens concentration limits will regulate hirudotherapy capacity on modern principles of evidence-based medicine. For the first time the phenomenon of apoptosis in immune cells of blood under the influence of biologically active substances of the medicinal leech is found. It may explain the mechanism of anti-inflammatory action of hirudotherapy. Also opens the prospect for further study of this phenomenon at the level of the organism with the further possibility of allergic and autoimmune diseases relief by targeting apoptosis through immune tolerance to allergens.

Keywords: hirudotherapy, biologically active substances, medicinal leeches, leukocytes, phagocytosis, cytometry, the reaction of lymphocytes blast transformation.

Одержано редколегією 09.04.2015