

## **СИНТЕЗ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 $\beta$ КУЛЬТУРАМИ МОНОНУКЛЕАРОВ, СТИМУЛИРОВАННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫМ МИТОГЕНОМ И АНТИГЕНАМИ КОЛЬЧЕЦОВ**

Фролов А.К., <sup>1</sup>Прилуцкий А.С., <sup>1</sup>Лесниченко Д.А.,  
Литвиненко Р.А., Федотов Е.Р., <sup>1</sup>Мацегора А.С.

*Запорожский национальный университет,  
69600, Украина, Запорожье, ул. Жуковского, 66*

<sup>1</sup>*Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького,  
83003, Украина, Донецк, пр. Ильича, 16*

a\_frolov@ukr.net

В культуре мононуклеаров 14 женщин (средний возраст 29,2 $\pm$ 2,97 лет), не имевших контакта с медицинской пиявкой, изучены уровни интерлейкина-1 $\beta$  (ИЛ-1 $\beta$ ) и его корреляционные связи с уровнями реакции бластной трансформации и уровнями ИЛ-8. Лимфоциты стимулировали растительным митогеном (ФГА) и антигенами солевого экстракта тел кольчецов (*Hirudo verbana*, *H. medicinalis*, *H. orientalis*, *Eisenia fetida*). Синтез ИЛ-1 $\beta$  в митоген- и антиген-стимулированных культурах мононуклеаров периферической крови доноров значительно превышал его спонтанные уровни, при отсутствии значимых различий от вида стимулятора. Выявлены положительные корреляционные связи концентрации ИЛ-1 $\beta$  в спонтанных, митоген- и антиген-стимулированных культурах лимфоцитов, тогда как с уровнями ИЛ-8 и реакции бластной трансформации ассоциативные связи данного цитокина были отрицательными, как результат его раннего синтеза при иммуногенезе.

*Ключевые слова: интерлейкин-1 $\beta$ , интерлейкин-8, реакция бластной трансформации лимфоцитов, медицинская пиявка, антигены, митогены, корреляция.*

## **СИНТЕЗ ИНТЕРЛЕЙКИНУ-1 $\beta$ КУЛЬТУРАМИ МОНОНУКЛЕАРІВ, СТИМУЛЬОВАНИХ РОСЛИННИМ МІТОГЕНОМ І АНТИГЕНАМИ КІЛЬЧЕЦІВ**

Фролов О.К., <sup>1</sup>Прилуцький О.С., <sup>1</sup>Лесніченко Д.О.,  
Литвиненко Р.О., Федотов Є.Р., <sup>1</sup>Мацегора А.С.

*Запорізький національний університет,  
69600, Україна, Запоріжжя, вул. Жуковського, 66*

<sup>1</sup>*Донецький національний медичний університет імені М. Горького,  
83003, Україна, Донецьк, пр. Ілліча, 16*

a\_frolov@ukr.net

У культурі мононуклеарів 14 жінок (середній вік 29,2 $\pm$ 2,97 років), які не мали контакту з медичною п'явкою, вивчені рівні інтерлейкіну-1 $\beta$  (ІЛ-1 $\beta$ ) і його кореляційні зв'язки з рівнями реакції бластної трансформації та рівнями ІЛ-8. Лімфоцити стимулювали рослинним митогеном (ФГА) і антигенами солевого екстракту тіл кільчеців (*Hirudo verbana*, *H. medicinalis*, *H. orientalis*, *Eisenia fetida*). Синтез ІЛ-1 $\beta$  в митоген- і антиген-стимульованих культурах мононуклеарів периферичної крові донорів значно перевищував його спонтанні рівні, при відсутності значимих відмінностей від виду стимулятора. Виявлені позитивні кореляційні зв'язки концентрації ІЛ-1 $\beta$  в спонтанних, митоген- і антиген-стимульованих культурах лімфоцитів, тоді як з рівнями ІЛ-8 та реакції бластної трансформації асоціативні зв'язки цього цитокина були негативними, як результат його раннього синтезу при імуногенезі.

*Ключові слова: інтерлейкін-1 $\beta$ , інтерлейкін-8, реакція бластної трансформації лімфоцитів, медична п'явка, антигени, митогени, кореляція.*

## **SYNTHESIS OF INTERLEUKIN-1 $\beta$ BY MONONUCLEAR CELLS CULTURES STIMULATED WITH PLANT MITOGEN AND ANNELIDS' ANTIGENS**

Frolov A.K., <sup>1</sup>Prilutskii A.S., <sup>1</sup>Lesnichenko D.A., Litvinenko R.A., Fedotov Ye.R., <sup>1</sup>Matsegora A.S.

*Zaporizhzhya National University,  
69600, Ukraine, Zaporizhzhya, st. Zhukovsky, 66*

<sup>1</sup>*Donetsk National Medical University of M. Gorky,  
83003, Ukraine, Donetsk, pr. Illich, 16*

a\_frolov@ukr.net

At present hirudotherapy (HT) is popular due to its therapeutic and prophylactic efficacy. However, the antigen (AG) activity of biologically active substances (BAS) from the medicinal leech (ML) and its

tissues antigens have just started to be investigated. But thus the ability of their complex in order to stimulate synthesis of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) has not been studied. The study aim was to investigate the influence of antigens complex of Pharmaceutical (*Hirudo verbana* Carena, 1820), medicinal/Ukrainian (*H. medicinalis* Linnaeus, 1758) and Oriental (*H. orientalis* S. Utevsky et Trontelj, 2005) medicinal leech, as well as antigens of common with them representative of the class of annelid worms – the red Californian worm (RCW, *Eisenia fetida* Savigny, 1826) on the synthesis of IL-1 $\beta$  in peripheral blood mononuclear cells. In addition, has been investigated the correlation of the IL-1 $\beta$  production by mononuclear cells and indicators of the reaction of lymphocyte blast-transformation (RLBT), synthesis of IL-8, one of the major chemokines.

From the venous blood of 14 women (mean age 29,2 $\pm$ 2,97 years) the culture of separated mononuclear cells was obtained. The lymphocytes were stimulated with plant mitogen (PHA) and AG of the salt extract from the bodies of the three ML species (Pharmaceutic, Ukrainian, Oriental) and RCW. Lymphocytes were cultured for 24 hours at the temperature of 37 $^{\circ}$ C. In the supernatant were determined the IL-1 $\beta$ , IL-8 by immunoenzymometric method, using the reagent kits LLC «UkrmedDon», Donetsk. Statistical processing of the experimental data was performed by application package «SPSS v. 20» using methods of nonparametric statistics.

The concentration of IL-1 $\beta$  in stimulated cultures was significantly higher than their spontaneous value. However, amplitude of oscillation levels of IL-1 $\beta$  in mitogen- and AG-stimulated cultures did not reach a statistically significant difference. It should also be noted that the concentration in supernatants of IL-1 $\beta$  in 3-4 times lower than such of IL-8 chemokine. Multiple differences of IL-1 $\beta$  and IL-8 synthesis levels in mitogen- and AG-stimulated lymphocyte cultures are probably the result of the natural sequence of the synthesis of pro- and anti-inflammatory cytokines complex with their simultaneous regulation. Increase in concentration of studied cytokines IL-1 $\beta$  and IL-8 in cultures of mononuclear cells stimulated by annelids AG, compared with control cultures is due to immunogenetic positive reactions. As donors did not have preliminary contact with AG of annelids (for example, HT) there were absent sensibilized lymphocytes to AG of ML in their immune system. Positive immunogenetic shifts (RLBT, cytokine synthesis) in AG-stimulated cultures of donors can be explained by the presence of common patterns in protein organization of all types. By Spearman rank correlation method established a strong direct correlation between the production of IL-1 $\beta$  in cultures of mononuclear cells stimulated with AG of Pharmaceutical and Oriental ML ( $r=0,969$ ), AG of Pharmaceutical ML and RCW ( $r=0,895$ ), AG of Oriental ML and RCW ( $r=0,864$ ). Special was the production of IL-1 $\beta$  in response to complex of AG Ukrainian ML, weak positive values of which did not reach significant levels with the intensity of the synthesis of this cytokine in mitogen- and AG-stimulated cultures of mononuclear cells, except with its spontaneous values ( $r=0,569$ ). Probable causes of separateness could be features of AG complex of Ukrainian ML, as well as the large amplitude of individual differences in cytokine synthesis and RLBT mononuclear cells in cell culture hence the fragmentary identify significant relationships between them. However, in the direction of relations reached and not reached significant differences can make conclusions about the regulatory relationship of studied in this work immunogenetic indicators. For example, the correlation values of IL-1 $\beta$  with the synthesis of IL-8 and RLBT mostly changed to negative values, especially for those that have reached significant differences. Thus, the levels of IL-1 $\beta$  synthesis in cultures with AG of Pharmaceutical and Oriental ML species negatively middle correlated with intensity of the synthesis of IL-8 in cell cultures stimulated with AG of Ukrainian species ML. Negative direction of communication provides a basis to assert that later time-dependent synthesis of IL-8 compared to the IL-1 $\beta$  synthesis of the latter have negatively regulated by other pro- and anti-inflammatory cytokines. The early and fast synthesis of a consistent negative regulation of IL-1 $\beta$  production also indicates negative communication levels of this cytokine values and RLBT. So, which reached representativeness of communication RLBT in spontaneous and AG Oriental ML middle and high correlated with the intensity of the synthesis of IL-1 $\beta$  in mitogen-stimulated cultures. Synthesis of IL-1 $\beta$  on annelids AG continued to be negatively correlated with the level of RLBT on AG of the Oriental ML. This fact is easily explained methodologically: RLBT in the culture of mononuclear cells morphologically we recorded after 24 hours, whereas the synthesis of IL-1 $\beta$  occurred in the early hours of productions culture. Must specify that revealed an inverse relationship between the level of spontaneous RLBT and level of IL-1 $\beta$  stimulated with a polyclonal mitogen, in principle, consistent with the detected earlier inverse relationship between the spontaneous and stimulated with PHA blast transformation reaction which was subsequently confirmed by many researchers.

Conclusions. 1. Synthesis of IL-1 $\beta$  in mitogen- and AG-stimulated cultures of peripheral blood mononuclear cells of donors significantly exceed its spontaneous levels ( $p < 0.05$ ) with no significant differences in the type of stimulant. 2. The positive correlation concentrations of IL-1 $\beta$  in spontaneous, mitogen- and AG-stimulated lymphocyte cultures, whereas the levels of IL-8 and RLBT associative relationships of this cytokine were negative as a result of his early synthesis at immunogenesis. 3. In the absence of pre-sensibilization synthesis of proinflammatory cytokines in RLBT-positive cultures of

mononuclear cells to the annelids AG is the result of stimulation the common patterns of protein in their organization. 4. The dynamics of the synthesis of IL-1 $\beta$  in mitogen- and AG-stimulated mononuclear culture must be taken into account in the analysis of the antigenic properties of annelids and in practice of hirudotherapy that closes it to the medical means of allowed by international protocols.

*Key words:* interleukin-1 $\beta$ , interleukin-8, lymphocyte blast-transformation reaction, medicinal leech, antigens, mitogens, correlation.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время гирудотерапия (ГТ) пользуется большим успехом благодаря её лечебно-профилактической эффективности, доступности и малому количеству противопоказаний [1-3]. Считается, что большинство терапевтических эффектов ГТ опосредуются через иммунную систему организма [4]. Однако антигенная активность биологически активных веществ (БАВ) слюны медицинской пиявки (МП), количество которых по данным электрофореграмм более ста [5] и антигенов (АГ) её тканей только начинает изучаться [6]. При этом совершенно не изучена способность их комплекса стимулировать синтез интерлейкина-1 $\beta$  (ИЛ-1 $\beta$ ). ИЛ-1 $\beta$  – является преобладающей формой ИЛ-1, относится к группе провоспалительных цитокинов, играет ключевую роль в развитии и регуляции неспецифической защиты и специфического иммунитета. Синтезируется и выделяется он преимущественно макрофагами и моноцитами. Необходимость дальнейшего углубленного исследования влияния МП на общий и местный иммунитет уже высказывалась рядом ученых [1]. Среди видов МП сейчас выделяют три: *Hirudo verbana*; *H. medicinalis*; *H. orientalis* [7].

В связи с вышеизложенным, целью нашей работы являлось изучение влияния комплекса антигенов аптечной (*Hirudo verbana* Carena, 1820), медицинской/украинской (*H. medicinalis* Linnaeus, 1758) и восточной (*H. orientalis* S. Utevsky et Trontelj, 2005) МП, а также антигенов общего с ними представителя класса кольчатых червей – красного калифорнийского червя (ККЧ, *Eisenia fetida* Savigny, 1826) на синтез ИЛ-1 $\beta$  мононуклеарами периферической крови. Кроме того, была исследована корреляция продукции мононуклеарами ИЛ-1 $\beta$  и показателей реакции бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ), синтеза ИЛ-8, одного из основных хемокинов. Данные по последним двум показателям были опубликованы нами ранее [8].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследовались лимфоциты 14 женщин доноров (средний возраст 29,2 $\pm$ 2,97 лет). Необходимо отметить, что отобранным для исследования донорам никогда не проводилась ГТ, а возможный контакт с дикими формами МП они отрицали.

Венозную кровь стабилизировали раствором кристаллического гепарина (0,2 мг/мл, Спофа). Из сепарированных на фиколл-верографиновом градиенте плотности ( $\rho=1,077$ ) лимфоцитов, после их отмывания забуференным раствором Хенкса [9], получали суспензию. Концентрацию её довели питательной смесью до 2 млн мононуклеаров в миллилитре. Питательная смесь готовилась из среды 199 и 10% эмбриональной телячьей сыворотки. В вышеуказанную смесь вносили: 0,3 мг/мл глутамина, 0,15 мг/мл аспарагина, 20 мМ НЕРЕС, 10 мМ 2-меркаптоэтанола, 100 мкг/мл гентамицина. Суспензию мононуклеаров (по 250 мкл) каждого обследованного лица помещали в 6 круглодонных микропробирок объемом 2 мл. У каждого из исследуемых определяли: 1 – спонтанную трансформацию, 2 – стимуляцию (20 мкг/мл) фитогемагглютинином (ФГА-М, Болгария), 3, 4, 5, 6 – соответственно бласттрансформацию в ответ на АГ (125 мкг/мл в пересчете на белок) из солевой вытяжки трёх видов МП (аптечной, украинской, восточной) и ККЧ. Солевой экстракт тканевых АГ и БАВ тел кольцецов получали согласно методу [10] в стерильных условиях. Лимфоциты культивировали 24 часа при температуре 37 $^{\circ}$ С.

Культуральный супернатант мононуклеарных клеток отбирали в микропробирки и хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ , не размораживая для определения ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-8. Для исследования вышеуказанных цитокинов использовались наборы высокочувствительного твёрдофазного иммуоферментного количественного анализа производства ООО «Укрмед-Дон», г. Донецк. Чувствительность данных тест-систем составила до 2 пг/мл.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы «SPSS v. 20». Проверку данных на нормальность распределения осуществляли с использованием критериев Колмогорова-Смирнова, Шапиро-Уилка. Учитывая непараметрическое распределение рядов, для оценки различий между зависимыми выборками использовали непараметрический критерий Уилкоксона (Wilcoxon test) для связанных выборок, при этом данные были представлены в виде Me (Q1; Q3), где Me – медиана, Q1 и Q3 – 1 и 3 квартиль. Достоверными считали различия результатов при  $P > 95\%$ ,  $p < 0,05$  [11].

Для определения статистической зависимости уровня ИЛ-1 $\beta$  с другими исследуемыми показателями (уровнями РБТЛ и синтезом ИЛ-8) использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена, где  $r$  – коэффициент корреляции [11].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Уровни синтеза ИЛ-1 $\beta$  мононуклеарами под влиянием ФГА и АГ колец представлены в табл. 1. Установлено, что концентрация исследуемого цитокина в стимулированных культурах значительно превышает его спонтанное значение. Однако амплитуды колебаний уровней ИЛ-1 $\beta$  в митоген- и АГ-стимулированных культурах не достигали статистически значимых различий. Следует также отметить, что концентрация в супернатантах ИЛ-1 $\beta$  значительно (в 3-4 раза) уступает таковой хемокину ИЛ-8 [8]. Так, например, концентрация ИЛ-8 в супернатантах культур мононуклеаров, стимулированных АГ аптечной, украинской и восточной МП, соответственно, равнялись 4078,6 (1621,4; 16705,6) пг/мл; 4051,6 (1982,1; 11375,1) пг/мл; 10187,5 (1467,0; 13245,5) пг/мл, по сравнению с контролем 357,3 (151,2; 773,8) пг/мл,  $p < 0,01$ . Тогда как показатели ИЛ-8 в АГ-стимулированных культурах статистически не различались между собой.

Таблица 1 – Уровни спонтанной и митоген/антиген-стимулированной продукции ИЛ-1 $\beta$  в культуре мононуклеаров доноров (n=14), пг/мл

№	Стимуляторы культуры мононуклеаров	Me	Q1	Q3
1	Спонтанная	29,36	18,15	50,19
2	ФГА	58,81*	48,99	80,80
3	АГ аптечной пиявки	54,62	33,46	111,61
4	АГ украинской пиявки	58,81*	52,90	88,15
5	АГ восточной пиявки	59,54*	36,47	97,67
6	АГ красного калифорнийского червя	54,24*	39,34	97,91

Примечание: \* –  $p < 0,05$  в сравнении со спонтанным образцом. Сравнение результатов с помощью непараметрического теста Уилкоксона для парных выборок.

Многочисленные различия уровней синтеза ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-8 в митоген- и АГ-стимулированных культурах лимфоцитов, вероятно, являются результатом природной последовательности синтеза комплекса про- и противовоспалительных цитокинов с одновременной их регуляцией. Так синтез цитокинов иммунокомпетентными и вспомогательными клетками происходит в первые минуты и часы после АГ/митогенной стимуляции [12]. При этом, ИЛ-1 $\beta$ , в силу своей функциональной плеiotропности, синтезируется одним из первых, мобилизируя клеточные системы и организм в целом к

активации. Поэтому он и первым подлежит негативной регуляции, как таковой, который выполнил свою функцию, со стороны других цитокинов, например ФНО- $\alpha$  [12].

Увеличение концентрации изученных цитокинов ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-8 в культурах мононуклеаров, стимулированных АГ кольцецов, по сравнению с контрольными культурами происходит вследствие позитивных иммуногенетических реакций. Так, под влиянием АГ кольцецов достоверно в 2-3 раза увеличивалась РБТЛ: контроль – 6,00 (3,88; 7,63)%, аптечная МП – 11,90 (8,15; 15,75)%, украинская МП – 10,60 (8,50; 13,35)% и восточная МП – 14,75 (12,15; 19,00)%. Следует отметить, что доноры не имели предварительного контакта с АГ кольцецов, например, при ГТ. Поэтому в их иммунной системе отсутствовали сенсibilизированные к АГ МП лимфоциты. Следовательно, положительные иммуногенетические сдвиги (РБТЛ, синтез цитокинов) в АГ-стимулированных культурах доноров можно объяснить наличием общих паттернов в белковой организации всех видов. Паттерны представляют собой стабильные последовательности из небольшого (около 8-15) числа аминокислотных остатков в структуре белков [13].

Формирование иммунного ответа начинается с взаимодействия паттерна в качестве лиганда с паттерн-распознающими рецепторами клеток врожденного иммунитета (дендритными клетками, макрофагами), которые через клеточные контакты и с помощью цитокинов вовлекают в иммуногенез лимфоциты [14]. С этих позиций получает логическое объяснение факт увеличения синтеза цитокинов и РБТЛ в культурах лимфоцитов, стимулированных АГ кольцецов, без предварительной сенсibilизации лимфоцитов доноров.

Высказанные предположения подтверждаются результатами определения статистической зависимости уровня ИЛ-1 $\beta$  с другими исследованными показателями методом ранговой корреляции Спирмена (табл. 2). Установлена сильная прямая корреляционная связь между продукцией ИЛ-1 $\beta$  в культурах мононуклеаров, стимулированных АГ МП аптечной и восточной ( $r=0,969$ ), АГ МП аптечной и ККЧ ( $r=0,895$ ), АГ МП восточной и ККЧ ( $r=0,864$ ). Несколько особенной была продукция ИЛ-1 $\beta$  в ответ на комплекс АГ украинской МП, слабые положительные значения которых не достигали достоверного уровня с интенсивностью синтеза данного цитокина в митоген- и АГ-стимулированных культурах мононуклеаров, за исключением его связи со спонтанными значениями ( $r=0,569$ ). Вероятными причинами обособленности могут быть особенности АГ комплекса украинской МП, а также большая амплитуда индивидуальных различий синтеза цитокинов и РБТЛ в культуре клеток мононуклеаров, отсюда и фрагментарное выявление достоверных связей между ними.

Однако по направлению связей, достигших и не достигших достоверных различий, можно делать выводы о регуляторных взаимоотношениях изучаемых в данной работе иммуногенезных показателей. Так, значения корреляции ИЛ-1 $\beta$  с синтезом ИЛ-8 и РБТЛ в своем большинстве поменялись на отрицательные значения, особенно для тех, которые достигли значимых различий. Так, уровни синтеза ИЛ-1 $\beta$  в культурах с АГ МП аптечного и восточного вида отрицательно средне коррелировали с интенсивностью синтеза ИЛ-8 в культурах клеток, стимулированных АГ МП украинского вида. Отрицательное направление связи дает основание утверждать о поздней временной зависимости синтеза ИЛ-8 по сравнению с ИЛ-1 $\beta$ , синтез последнего уже отрицательно регулируется другими про- и противовоспалительными цитокинами.

Известно, что ИЛ-8 в качестве хемокина мобилизует нейтрофилы, как один из основных клеточных компонентов воспалительной реакции организма на нарушение антигенструктурного гомеостаза [14].

Таблица 2 – Показатели коэффициента корреляции Спирмена между значениями продукции ИЛ-1 $\beta$  мононуклеарами крови доноров и уровнями ИЛ-8, РБТЛ

Исследуемые показатели		ИЛ-1 $\beta$					
		Спонт.	ФГА	(апт)	(укр)	(вост)	ККЧ
ИЛ-1 $\beta$	Спонт.	1,000					
	ФГА	-0,007	1,000				
	(апт)	-0,349	0,099	1,000			
	(укр)	<b>0,569*</b>	0,165	0,033	1,000		
	(вост)	-0,327	0,182	<b>0,969**</b>	0,108	1,000	
	ККЧ	-0,204	-0,090	<b>0,895**</b>	0,160	<b>0,864**</b>	1,000
ИЛ-8	Спонт.	0,011	0,073	-0,121	-0,415	0,020	-0,165
	ФГА	0,301	0,165	-0,415	-0,095	-0,327	-0,464
	(апт)	-0,077	-0,297	-0,196	-0,380	-0,152	-0,253
	(укр)	0,415	-0,345	<b>-0,534*</b>	-0,077	<b>-0,582*</b>	-0,477
	(вост)	0,191	-0,086	-0,301	-0,125	-0,288	-0,349
	ККЧ	0,235	0,174	-0,402	-0,279	-0,371	-0,411
РБТЛ	Спонт.	-0,088	<b>-0,668**</b>	-0,163	-0,289	-0,227	0,040
	ФГА	0,123	0,079	0,244	0,440	0,191	0,249
	(апт)	-0,314	-0,402	0,130	0,033	0,213	0,209
	(укр)	0,055	-0,348	0,090	0,064	0,057	0,205
	(вост)	-0,081	<b>-0,635*</b>	<b>-0,543*</b>	-0,266	<b>-0,534*</b>	-0,481
	ККЧ	-0,044	0,469	-0,298	0,027	-0,360	-0,261

Примечание: \* – указанные значения коэффициента корреляции, статистически значимо отличающиеся от 0 при  $p < 0,05$ ; \*\* – указанные значения коэффициента корреляции, статистически значимо отличающиеся от 0 при  $p < 0,01$ .

На ранний синтез и быструю последовательную отрицательную регуляцию продукции ИЛ-1 $\beta$  указывают также отрицательные связи уровней данного цитокина и величины РБТЛ. Так, дошедшая до репрезентативности связь РБТЛ в спонтанных и АГ восточной МП стимулированных культур, средне и высоко коррелировала с интенсивностью синтеза ИЛ-1 $\beta$  в митоген-стимулированных культурах. А синтез ИЛ-1 $\beta$  на АГ кольцевых продолжал отрицательно коррелировать с уровнем РБТЛ на АГ восточной МП. Данный факт легко объясним методологически: РБТЛ в культуре мононуклеаров мы регистрировали морфологически через 24 часа, тогда как синтез ИЛ-1 $\beta$  происходил в первые часы постановки культуры. Необходимо указать, что выявленная обратная связь между спонтанной РБТЛ и уровнем стимулированного поликлональным митогеном ИЛ-1 $\beta$ , в принципе, согласуется с обнаруженной нами ранее обратной зависимостью между спонтанной и стимулированной ФГА реакцией бласттрансформации [15], которая затем была подтверждена многими исследователями.

В заключение следует отметить, что на выявляемость связей между изучаемыми показателями влияет наличие ассоциаций в продукции цитокинов различными клетками, выявлено разными исследователями, явление стимуляции освобождения интерлейкина 8 интерлейкином 1 $\beta$ , индукции синтеза их одним и тем же сигналом и др. [16-18]. Однако при этом следует отметить многообразие сигнальных путей синтеза этих цитокинов, влияние различных условий (в том числе и соотношение клеточных популяций,

концентрации других цитокинов, времени культивирования, биологических особенностей стимуляторов и прочее) на их синтез, что, несомненно, может обуславливать возможность вариабельности данных связей [19-21].

Перспективным является дальнейшее изучение реактивности лимфоцитов на антигены кольцецов, которое позволит в дальнейшем стандартизовать и приблизить гирудотерапию к лечебным средствам, разрешенным международными протоколами.

### ВЫВОДЫ

1. Синтез ИЛ-1 $\beta$  в митоген- и АГ-стимулированных культурах мононуклеаров периферической крови доноров значительно превышал его спонтанные уровни ( $p < 0,05$ ) при отсутствии значимых различий от вида стимулятора.
2. Выявлены положительные корреляционные связи концентрации ИЛ-1 $\beta$  в спонтанных, митоген- и АГ-стимулированных культурах лимфоцитов, тогда как с уровнями ИЛ-8 и РБТЛ ассоциативные связи данного цитокина были отрицательными, как результат его раннего синтеза при иммуногенезе.
3. При отсутствии предварительной сенсibilизации синтез провоспалительных цитокинов в РБТЛ-положительных культурах мононуклеаров на АГ кольцецов происходил в результате стимуляции общих паттернов в их белковой организации.
4. Динамику синтеза ИЛ-1 $\beta$  в митоген- и АГ-стимулированной культуре мононуклеаров следует учитывать при анализе антигенных свойств кольцецов и в практической работе при проведении гирудотерапии, приближая её к лечебным средствам, разрешенным международными протоколами.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Пересадин Н. А. Гирудотерапия в современной клинической медицине и реабилитологии / Н. А. Пересадин, В. М. Фролов, Л. В. Кузнецова // Проблемы екологічної та медичної генетики і клінічної імунології : зб. наук. праць. – 2009. – Вип. 1-2. – С. 98-119.
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. – М. : Norwell Partners Inc., 2013. – С. 8-11.
3. Leech therapeutic applications / [Abdualkader A. M., Ghawi A. M., Alaama M. et al.] // Indian. J. Pharm. Sci. – 2013. – Vol. 75(2). – P. 127-137.
4. 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.
5. Каменев О. Ю. Лечение пиявками: теория и практика гирудотерапии: руководство для врачей / О. Ю. Каменев, А. Ю. Барановский. – СПб. : ИГ «Весь», 2006. – 304 с.
6. Баскова И. П. Гирудотерапия. Наука и практика / И. П. Баскова, Г. С. Исаханян. – М. : 2004. – 508 с.
7. Chromosome numbers for three species of medicinal leeches (*Hirudo* spp.) / [Utevsky S., Kovalenko N., Doroshenko K. et al.] // Syst. Parasitol. – 2009. – Vol. 74 (2). – P. 95–102.
8. Синтез интерлейкина-8 и реакция бластной трансформации лимфоцитов, стимулированных растительным митогеном и антигенами кольцецов / [Прилуцкий А. С., Фролов А. К., Лесниченко Д. А. и др.] // Імунологія та алергологія : наука і практика. – 2014. – № 2. – С. 71-75.
9. Лимфоциты : Методы / [под ред. Дж. Клауса; пер. с англ.]. – М. : Мир, 1990. – 395 с.

10. 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.
11. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц; пер. с англ. – М. : Практика, 1999. – 459 с.
12. The Cytokine Handbook / Ed. by Angus W. Thomson, Michael T. Lotze. – 4th edition. – London, San Diego: Academic Press, 2003. – Vol. I. – 1396 p.
13. Лебедев К. А. Иммунология образраспознающих рецепторов: Интегральная иммунология / К. А. Лебедев, И. Д. Понякина. – 2-е изд. – М. : Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2013. – 256 с.
14. Дранник Г. Н. Клиническая иммунология и аллергология: пособ. / Г.Н. Дранник, А. Г. Дранник. – 5-е изд., доп. – К. : Полиграф-плюс, 2011. – 561 с.
15. Прилуцкий А. С. Вакцинация детей с изменённой реактивностью против коклюша, дифтерии и столбняка в условиях консультативных кабинетов по иммунопрофилактике : автореф. дис. на соискание ученой степени канд. мед. наук : спец. 14.00.30 «Эпидемиология»/ А. С. Прилуцкий. – Донецк, 1982. – 17 с.
16. Adhesive interaction between peripheral blood mononuclear cells and activated platelets in the presence of anti-human leukocyte antigen Class I alloantibody causes production of IL-1 $\beta$  and IL-8 / [Takahashi D., Fujihara M., Azuma H. et al.] // *Vox Sang.* – 2012. – Vol. 102, № 3. – P. 250-257.
17. IL-1 $\beta$  Upregulates IL-8 Production in Human Müller Cells Through Activation of the p38 MAPK and ERK1/2 Signaling Pathways / [Liu X., Ye F., Xiong H. et al.] // *Inflammation.* – 2014. – Vol. 37, № 5. – P. 1486-1495.
18. Kineret®/IL-1ra blocks the IL-1/IL-8 inflammatory cascade during recombinant Panton Valentine Leukocidin-triggered pneumonia but not during *S. aureus* infection / [Labrousse D., Perret M., Hayez D. et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, № 6. – P. e97546.
19. Al-Attayah R. Comparative analysis of spontaneous and mycobacterial antigen-induced secretion of Th1, Th2 and pro-inflammatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells of tuberculosis patients / R. Al-Attayah, A. El-Shazly, A. S. Mustafa // *Scand. J. Immunol.* – 2012. – Vol. 75, № 6. – P. 623-632.
20. Re-evaluation of anti-inflammatory potential of eugenol in IL-1 $\beta$ -stimulated gingival fibroblast and pulp cells / [Koh T., Murakami Y., Tanaka S. et al.] // *In Vivo.* – 2013. – Vol. 27, № 2. – P. 269-273.
21. Yoshimura T. Modulation of cytokine production from human mononuclear cells by several agents / T. Yoshimura // *Yakugaku Zasshi.* – 2000. – Vol. 120, № 12. – P. 1277-1290.

## REFERENCES

1. Peresadin N. A. Girudoterapiya v sovremennoi klinicheskoi meditsine i reabilitologii / N. A. Peresadin, V. M. Frolov, L. V. Kuznetsova // *Problemy ekologichnoi' ta medychnoi' genetyky i klinichnoi' imunologii' : zb. nauk. prac'.* – 2009. – Vyp. 1-2. – S. 98-119.
2. Sukhov K. V. Fundamental'nye voprosy girudoterapii: lechenie meditsinskimi piyavkami i teoriya obshchei patologii / V. K. Sukhov // *Pervyi Vsemirnyi kongress girudoterapii: tezisy dokladov.* Moskva, 24-25 sentyabrya 2013 g. – М. : Norwell Partners Inc., 2013. – S. 8-11.
3. Leech therapeutic applications / [Abdualkader A. M., Ghawi A. M., Alaama M. et al.] // *Indian. J. Pharm. Sci.* – 2013. – Vol. 75(2). – P. 127-137.

4. Vpliv biologichno aktivnikh rechovin medichnoi p'yavki na izol'ovani zrazki krovi pid chas girudoterapii / O. K. Frolov, V. V. Kopyika, E. R. Fedotov, R. O. Litvinenko // Eksperimental'na ta klinichna fiziologiya i biokhimiya. – 2010. – № 3 (51). – S. 36-40.
5. Kamenev O. Yu. Lechenie piyavkami: teoriya i praktika girudoterapii: rukovodstvo dlya vrachei / O. Yu. Kamenev, A. Yu. Baranovskii. – SPb. : IG «Ves'», 2006. – 304 s.
6. Baskova I. P. Girudoterapiya. Nauka i praktika / I. P. Baskova, G. S. Isakhanyan. – M. : 2004. – 508 s.
7. Chromosome numbers for three species of medicinal leeches (*Hirudo* spp.) / [Utevsky S., Kovalenko N., Doroshenko K. et al.] // Syst. Parasitol. – 2009. – Vol. 74 (2). – P. 95–102.
8. Sintez interleikina-8 i reaktsiya blastnoi transformatsii limfotsitov, stimulirovannykh rastitel'nykh mitogenom i antigenami kol'chetsov / [Prilutskii A. S., Frolov A. K., Lesnichenko D. A. i dr.] // Immunologiya ta alergologiya : nauka i praktika. – 2014. – № 2. – S. 71-75.
9. Limfotsity : Metody / [pod red. Dzh. Klausia; per. s angl.]. – M. : Mir, 1990. – 395 s.
10. Pat. 80665 Ukraïna, (51) MPK (2013.01), A61K 38/00 A61K 39/00. Sposib otrymannja antygeniv iz medychnoi p'yavky / Frolov O. K., Lytvynenko R. O., Kopyika V. V., Fedotov Je. R.; vlasnyk Derzhavnyj vyshhyj navchal'nyj zaklad «Zaporiz'kyj nacional'nyj universytet» Ministerstva osvity i nauky, molodi ta sportu Ukraïny. – № u 2012 13751 ; zajavl. 03.12.2012 ; opubl. 10.06.2013, Bjul. № 11.
11. Glanc S. Medyko-byologicheskaja statystyka / S. Glanc; per. s angl. – M. : Praktyka, 1999. – 459 s.
12. The Cytokine Handbook / Ed. by Angus W. Thomson, Michael T. Lotze. – 4th edition. – London, San Diego: Academic Press, 2003. – Vol. I. – 1396 p.
13. Lebedev K. A. Immunologiya obrazraspoznayushchikh retseptorov: Integral'naya immunologiya / K. A. Lebedev, I. D. Ponyakina. – 2-e izd. – M. : Knizhnyi dom «LIBROKOM», 2013. – 256 s.
14. Drannik G. N. Klinicheskaya immunologiya i allergologiya: posob. / G. N. Drannik, A. G. Drannik. – 5-e izd., dop. – K. : Poligraf-plyus, 2011. – 561 s.
15. Prilutskii A. S. Vaktsinatsiya detei s izmenennoi reaktivnost'yu protiv koklyusha, difterii i stolbnyaka v usloviyakh konsul'tativnykh kabinetov po immunoprofilaktike : avtoref. dis. na soiskanie uchenoy stepeni kand. med. nauk : spets. 14.00.30 «Epidemiologiya»/ A. S. Prilutskii. – Donetsk, 1982. – 17 s.
16. Adhesive interaction between peripheral blood mononuclear cells and activated platelets in the presence of anti-human leukocyte antigen Class I alloantibody causes production of IL-1 $\beta$  and IL-8 / [Takahashi D., Fujihara M., Azuma H. et al.] // Vox Sang. – 2012. – Vol. 102, № 3. – P. 250-257.
17. IL-1 $\beta$  Upregulates IL-8 Production in Human Müller Cells Through Activation of the p38 MAPK and ERK1/2 Signaling Pathways / [Liu X., Ye F., Xiong H. et al.] // Inflammation. – 2014. – Vol. 37, № 5. – P. 1486-1495.
18. Kineret®/IL-1ra blocks the IL-1/IL-8 inflammatory cascade during recombinant Panton Valentine Leukocidin-triggered pneumonia but not during *S. aureus* infection / [Labrousse D., Perret M., Hayez D. et al.] // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № 6. – P. e97546.
19. Al-Attiah R. Comparative analysis of spontaneous and mycobacterial antigen-induced secretion of Th1, Th2 and pro-inflammatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells of tuberculosis patients / R. Al-Attiah, A. El-Shazly, A. S. Mustafa // Scand. J. Immunol. – 2012. – Vol. 75, № 6. – P. 623-632.
20. Re-evaluation of anti-inflammatory potential of eugenol in IL-1 $\beta$ -stimulated gingival fibroblast and pulp cells / [Koh T., Murakami Y., Tanaka S. et al.] // In Vivo. – 2013. – Vol. 27, № 2. – P. 269-273.
21. Yoshimura T. Modulation of cytokine production from human mononuclear cells by several agents / T. Yoshimura // Yakugaku Zasshi. – 2000. – Vol. 120, № 12. – P. 1277-1290.