

24. Min'ko A.A. Statisticheskij analiz v MS Excel / A.A. Min'ko. – M. : Izdatel'skij dom «Vil'jams», 2004. – 448 s.
25. Karelin A. Bol'shaja jenciklopedija psihologicheskikh testov / A. Karelin. – M. : Jeksmo, 2007. – 416 s.
26. Rusalov V. M. Psihologija i psihofiziologija individual'nyh razlichij: nekotorye itogi i blizhajshie zadachi sistemnyh issledovanij / V.M. Rusalov // Psihologicheskij zhurnal. – 1991. – T. 12, № 5. – S. 3-15.
27. Krupnov A.I. Psihologicheskie problemy issledovanija aktivnosti cheloveka / A.I. Krupnov // Voprosy psihologii. – 1984. – № 3. – S. 25-32.
28. Rusalov V. M. Novyj variant adaptacii lichnostnogo testa EPI / V.M. Rusalov // Psihologicheskij zhurnal. – 1987. – T. 8, № 1. – S. 67-73.
29. Il'in E.P. Psihologija sporta / E.P. Il'in. – SPb. : Piter, 2008. – 352 s. – (Serija «Uchebnik novogo veka»).
30. Borisova M.N. Opredelenie porogov razlichenija i vyrabotka tonkih sensoryh differencirovok kak put' k izucheniju koncentrirovannosti processa vozbuzhdenija / M.N. Borisova // Tipologicheskie osobennosti vysshej nervnoj dejatel'nosti cheloveka. – M. : Izd. APN RSFSR, 1959. – T. 2. – S. 199-219.
31. Gray J.A. A theory of anxiety: the role of the limbic system / J.A. Gray // Encephale. – 1983. – Vol. 9, № 4. – Suppl.2. – P. 161B-166B.
32. Krapivnickaja T.A. Prognosticheskaja znachimost' issledovanija individual'no-lichnostnyh osobennostej pilotov grazhdanskoj aviacii / T.A. Krapivnickaja // Fiziologija cheloveka. – 2007. – T. 33, № 1. – S. 97-100.
33. Gorozhanin V.S. Skorostnye sposobnosti cheloveka i podvizhnost' nervnoj sistemy / V.S. Gorozhanin // Teorija i praktika fizicheskaj kul'tury. – 1994. – № 10. – S. 31-33.
34. Aminov N.A. O nekotoryh psihofiziologicheskikh faktorah, opredelajushhijh individual'nuju ustojchivost' k dejstvu odnoobrazija / N.A. Aminov // Differencial'naja psihofiziologija i ee geneticheskie aspekty: tezisy dokl. (Perm', 18-20 ijunja 1975 g.). – M., 1975. – S. 11-13.
35. Apanasenko G. L. Medicinskaja valeologija / G.L. Apanasenko, L.A. Popova. – K. : Zdorov'ja, 1998. – 244 s.
36. Apanasenko G.L. Somaticheskoe zdorov'e i maksimal'naja ajerobnaja sposobnost' individa / G.L. Apanasenko, R.G. Naumenko // Teorija i praktika fizicheskaj kul'tury. – 1986. – № 4. – S. 29-31.
37. Ivashhenko L.Ja. Morfo-funktional'naja charakteristika razlichnyh urovnej fizicheskogo sostojanija zhenshhin zrelogo vozrasta / L.Ja. Ivashhenko, E.I. Gorpichenko, A.L. Blagij // Modelirovanie i kompleksnoe testirovanie v ozdorovitel'noj fizicheskaj kul'ture: sb. nauch. tr. – M. : Gosport SSSR. VNIIFK., 1991. – S. 164-179.

УДК596.14:577:616-097

СИНТЕЗ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ- α , АПОПТОЗ И НЕКРОЗ МОНОНУКЛЕАРОВ, СТИМУЛИРОВАННЫХ РАСТИТЕЛЬНОМ МИТОГЕНОМ И АНТИГЕНАМИ КОЛЬЦЕЦОВ

¹Прилуцкий А. С., ²Фролов А. К., ¹Лесниченко Д. А.,
²Литвиненко Р. А., ²Федотов Е. Р., ¹Мацегора А. С.

¹Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького
83003, Украина, Донецк, пр. Ильича, 16
²Запорожский национальный университет
69600, Украина, Запорожье, ул. Жуковского, 66

a_frolov@ukr.net

В культуре мононуклеаров 22 женщин (средний возраст $29,2 \pm 2,97$ лет), не имевших контакта с медицинской пиявкой, изучены уровни фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) и реакции бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ) при стимуляции растительным митогеном – фитогемагглютинином (ФГА) и тканевыми антигенами солевого экстракта кольцецов (*Hirudo verbana*, *H. medicinalis*, *H. orientalis*, *Eisenia fetida*). Установлено, что синтез ФНО- α стимулированными культурами мононуклеаров крови доноров значительно превышал спонтанные уровни (кроме культур стимулированных антигенами *E. fetida*). В культурах, стимулированных антигенами медицинской пиявки, синтез ФНО- α достоверно не отличался в зависимости от их видов. Наибольшая интенсивность РБТЛ была выявлена в культурах мононуклеаров, стимулированных ФГА, при этом между показателями культур клеток, стимулированных антигенами медицинской

пывки, достовірних различий виявлено не було. Показатели РБТЛ при стимуляції антигенами *E. fetida* були достовірно вище таких, стимулизованих антигенами медичної п'явки, однак подавляюче більшість лимфоцитів мали ознаки некрозу. При цьому в інших антиген-індукованих культурах було доволі значительне кількість клітин в стані апоптозу і некрозу ($p < 0,05$ в порівнянні з контролем), які становили до 14–17% від числа стимулизованих.

Ключевые слова: фактор некрозу опухоли- α , реакція бластної трансформації лимфоцитів, медична п'явка, антигени, мітогени.

¹Прилуцький О. С., ²Фролов О. К., ¹Лесніченко Д. О., ²Литвиненко Р. О., ²Федотов Є. Р., ¹Мацегора А.С. СИНТЕЗ ФАКТОРА НЕКРОЗУ ПУХЛИНИ- α , АПОПТОЗ І НЕКРОЗ МОНОНУКЛЕАРІВ, СТИМУЛЬОВАНИХ РОСЛИННИМ МІТОГЕНОМ І АНТИГЕНАМИ КІЛЬЧЕЦІВ / ¹Донецький національний медичний університет імені М.Горького, 83003, Україна, Донецьк, пр. Ілліча, 16; ²Запорізький національний університет, 69600, Україна, Запоріжжя, вул. Жуковського, 66

У культурі мононуклеарів 22 жінок (середній вік $29,2 \pm 2,97$ років), що не контактували з медичною п'явкою, досліджені рівні фактора некрозу пухлини- α (ФНП- α) та реакції бластної трансформації лимфоцитів (РБТЛ) при стимулюванні рослинним мітогеном – фітогемаглютиніном (ФГА) та тканинними антигенами сольового екстракту кільчеців (*Hirudo verbana*, *H. medicinalis*, *H. orientalis*, *Eisenia fetida*). Встановлено, що синтез ФНП- α стимулизованими культурами мононуклеарів крові донорів значно перевищував спонтанні рівні (крім культур стимулизованих антигенами *E. fetida*). У культурах, стимулизованих антигенами медичної п'явки, синтез ФНП- α достовірно не відрізнявся залежно від їх видів. Найбільша інтенсивність РБТЛ була виявлена в культурах мононуклеарів, стимулизованих ФГА, при цьому між показниками культур клітин, стимулизованих антигенами медичної п'явки, достовірних відмінностей виявлено не було. Показники РБТЛ при стимуляції антигенами *E. fetida* були достовірно вищими від таких, стимулизованих антигенами медичної п'явки, проте переважна більшість лимфоцитів мала ознаки некрозу. При цьому в інших антиген-індукованих культурах була досить значна кількість клітин в стані апоптозу і некрозу ($p < 0,05$ у порівнянні з контролем), які становили до 14-17% від числа стимулизованих.

Ключові слова: фактор некрозу пухлини- α , реакція бластної трансформації лимфоцитів, медична п'явка, антигени, мітогени.

¹Prilutskii A.S., ²Frolov A.K., ¹Lesnichenko D.A., ²Litvinenko R.A., ²Fedotov Ye.R., ¹Matsegora A.S. SYNTHESIS OF TUMOR NECROSIS FACTOR- α , APOPTOSIS AND NECROSIS OF MONONUCLEAR CELLS CULTURES STIMULATED WITH PLANT MITOGEN AND ANnelid'S ANTIGENS / ¹Donetsk National Medical University of M. Gorky, 83003, Ukraine, Donetsk, pr. Illich, 16; ²Zaporizhzhya National University, 69600, Ukraine, Zaporizhzhya, Zhukovsky str., 66

Currently hirudotherapy is widely used due to its therapeutic and prophylactic effectiveness. It is known that some therapeutic and prophylactic effects of hirudotherapy are caused by interactions of biologically active substances (BAS) of the medicinal leech with mammalian immune system. But antigenic activity of individual medicinal leech species, its BAS antigens and tissues antigens are still poorly studied. The study aim was to investigate the influence of antigens complex of Pharmaceutic (*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 (*Eisenia fetida* Savigny, 1826) on the synthesis of TNF- α , apoptosis and necrosis of peripheral blood mononuclear cells.

From the venous blood of 22 women (mean age $29,2 \pm 2,97$ years) the culture of separated mononuclear cells was obtained. The lymphocytes were stimulated with plant mitogen – phytogemagglutinin (PHA) and antigens of the salt extract from the bodies of the three medicinal leech species (*H. verbana*, *H. medicinalis*, *H. orientalis*) and red Californian worm (*E. fetida*). Lymphocytes were cultured for 24 hours at the temperature of 37°C. From the sediment of cell culture were prepared smears, that were fixed with methanol and stained by Pappenheim method and were differentiated in distilled water acidified with hydrochloric acid. The reaction of lymphocyte's blast transformation (RBTL) was evaluated by the morphological method with analyzed 400-600 cells. At the analysis taking into account the blast transformed lymphocyte (small, medium, large) and lymphocytes with morphological signs of apoptosis and necrosis. In the cultural supernatant of 14 donors were determined the TNF- α by immunoenzymometric method, using the reagent kits LLC «UkrmedDon», Donetsk. Statistical processing of the experimental data was performed by application package «MedStat» using methods of nonparametric statistics.

The concentration of TNF- α in stimulated cultures significantly exceeds the spontaneous value, except for cultures stimulated with antigens of *E. fetida*. The levels of TNF- α in cell cultures stimulated with antigens of *H. verbana*, *H. medicinalis* and *H. orientalis* were significantly ($p < 0.05$) higher than those in cultures stimulated with PHA, and thus did not significantly differ depending on the species. It is revealed significantly higher synthesis of TNF- α ($p < 0.05$) in mitogen-stimulated cultures as compared to the same indicator at stimulation with antigens of *E. fetida*.

Morphologic study of RBTL were identified cells with normal morphology, with signs of apoptosis and necrosis. The highest intensity of lymphocytes blast transformation was identified in cultures of mononuclear cells stimulated with polyclonal mitogens ($p < 0,05$), in this case between the indices of cell cultures stimulated with antigens of three species of medicinal leech significant differences has not been revealed, although the level of RBTL response to antigens of *H. orientalis* was the highest and significantly different from control data.

Most of the blasts-transformed lymphocytes in cultures stimulated with polyclonal mitogen (PHA) had normal morphology of the cells, whereas among the lymphocytes cultures stimulated with antigens of *E. fetida* with normal morphology were only 9,8%, and the majority of cells (90,2%) had signs of apoptosis (8,5%) and necrosis (81,7%). At the same time other of antigeninduced cultures it should be noted relative rather significant number of cells in a position as an apoptosis as well necrosis ($p < 0,05$ compared to controls), which make up 14-17% of the stimulated lymphocytes (for RBTL the overall level of of 10,7 to 14,25% – of these types of cells 1,5-2,5%). Then as in cultures stimulated with mitogens and in control, blast-transformed lymphocytes with signs of apoptosis and necrosis were rarely found. Thus, among cultures stimulated with antigens of medicinal leech the number of cells with signs of apoptosis varied from $1,5 \pm 0,2$ to $2,0 \pm 0,26\%$, and with signs of necrosis – from $0,0 \pm 0,19$ to $0,5 \pm 0,17\%$.

Significant induction of TNF- α by mononuclear cells when stimulated by antigens of different species of medicinal leeches indicates the presence of quite significant antigenic reactivity, and relatively high levels of apoptosis and necrosis among induced form of peripheral blood mononuclear cells suggests that these effects may play, at least partially, role in the anti-inflammatory action of BAS of the medicinal leech.

Conclusions. 1. Synthesis of TNF- α by stimulated peripheral blood mononuclear cells cultures of donors is significantly higher ($p < 0,05$), than its spontaneous levels (except for cultures stimulated with antigens of *E. fetida*, values for which there was no statistically significant difference with the control), while in antigen-stimulated (antigens of medicinal leech) cultures synthesis of TNF- α was not significantly different according to their species. 2. The highest intensity of lymphocytes blast transformation was found in cultures of mononuclear cells stimulated with PHA ($p < 0,05$), while between the indices of cell cultures stimulated with antigens of three species medicinal leech significant differences were not detected, but (among them) the level of RBTL to the antigens of *H. orientalis* was the highest and significantly different from the control. 3. Indicators RBTL at stimulating antigen *E. fetida* were significantly higher ($p < 0,05$) than in cultures of cells stimulated with leech's antigens, but the overwhelming majority of lymphocytes (90,2%) showed signs of necrosis. In the other antigen-induced cultures should be noted relative fairly large number of cells able to both apoptosis and necrosis ($p < 0,05$ versus control), which make up 14-17% of the stimulated cells. 4. The results should be considered when analyzing the properties of the BAS and tissue antigens different species of medicinal leech, including during hirudotherapy.

Key words: tumor necrosis factor- α , lymphocyte blast-transformation reaction, medicinal leech, antigens, mitogens.

ВВЕДЕНИЕ

Первые сведения об использовании пиявок относятся к Древнему Египту. Они представлены настенными росписями, обнаруженными в гробницах фараонов 18 династий (1567-1308 гг. до н.э.). Сейчас гирудотерапия (ГТ) все более широко используется благодаря её лечебно-профилактической эффективности [1,2]. Известно, что часть терапевтических и профилактических эффектов ГТ обусловлены взаимодействием биологически активных веществ (БАВ) медицинской пиявки (МП) с иммунной системой организма [3,4]. Однако антигенная активность МП, антигены (АГ) её БАВ и тканей, до настоящего времени мало изучены [5,6]. Среди использующихся видов МП сейчас выделяют три: *Hirudo verbana*, *H. medicinalis*, *H. orientalis* [7]. В литературе отсутствуют сведения о влиянии АГ вышеуказанных видов МП на синтез фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) культурами мононуклеаров, их апоптоз и некроз. ФНО- α – многофункциональный провоспалительный цитокин, получивший название благодаря способности лизировать большой набор опухолевых клеток *in vivo* и *in vitro* [8]. Синтезируется и выделяется он преимущественно макрофагами и моноцитами при их активации [9].

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) медицинской пиявки, а также антигенов общего представителя класса кольчатых червей – красного калифорнийского червя (ККЧ, *Eisenia fetida* Savigny, 1826) на синтез ФНО- α , апоптоз и некроз мононуклеаров периферической крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследовались лимфоциты 22 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, Спoфа). Из сепарированных на фиколл-верографиновом градиенте плотности ($\rho=1,077$) лимфоцитов, после их отмывания забуференным раствором Хенкса, получали суспензию. Концентрацию её доводили 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 HEPES, 10 μ М 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 бласттрансформацию, 2 – стимуляцию (20 мкг/мл) фитогемагглютинина (ФГА-М, Болгария), 3, 4, 5, 6 – бласттрансформацию в ответ на АГ (125 мкг/мл в пересчете на белок) солевой вытяжки, соответственно, трёх видов МП (аптечной, украинской, восточной) и ККЧ. Солевой экстракт тканевых АГ и БАВ колец получали согласно методу [10] в стерильных условиях. Лимфоциты культивировали 24 часа при температуре 37 $^{\circ}$ С. Из осадка культуры клеток готовили мазки, фиксировали метанолом, окрашивали по Паппенгейму с дифференцировкой в подкисленной соляной кислотой дистиллированной воде. Реакцию бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ) оценивали морфологическим методом, при анализе 400-600 клеток. Учитывали бласты (малые, средние, большие) и лимфоциты с морфологическими признаками апоптоза и некроза.

Культуральный супернатант мононуклеарных клеток 14 из 22 вышеуказанных доноров отбирали в микропробирки и хранили при -20 $^{\circ}$ С, не размораживая для определения ФНО- α . Для исследования вышеуказанного цитокина использовались наборы высокочувствительного твёрдофазного иммуноферментного количественного анализа производства ООО «Укрмед-Дон», г. Донецк, зарегистрированные в Украине. Чувствительность данных тест-систем составила до 2 пг/мл.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы «MedStat». Проверку данных на нормальность распределения осуществляли с использованием критерия Шапиро-Уилка. Учитывая непараметрическое распределение рядов, для оценки различий между зависимыми выборками использовали множественные сравнения, критерий Данна. 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. Процент погрешности для значений апоптоза и некроза равных нулю считался, исходя из общего количества стимулированных лимфоцитов. Достоверными считали различия результатов при $P > 95\%$, $p < 0,05$ [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Уровни синтеза ФНО- α мононуклеарами под влиянием ФГА и АГ колец представлены в таблице 1. Установлено, что концентрация исследуемого цитокина в стимулированных культурах значительно превышает его спонтанное значение, кроме культур, стимулированных АГ ККЧ. При сравнении значений цитокина в культурах стимулированных АГ ККЧ с аналогичными показателями контроля статистически значимой разницы выявлено не было. Следует также отметить, что значения уровней ФНО- α в культурах клеток, стимулированных АГ аптечной, медицинской, украинской МП, оказались достоверно ($p < 0,05$) выше таковых в культурах, стимулированных ФГА, и при этом существенно не отличались друг от друга. Необходимо также указать на наличие существенно большего синтеза ФНО- α ($p < 0,05$) в культурах стимулированных поликлональным митогеном, по сравнению с аналогичным показателем при стимуляции

продукции данного цитокина АГ ККЧ.

Таблица 1 – Уровни спонтанной и митоген/антиген-стимулированной продукции ФНО- α в культуре мононуклеаров доноров (n=14), пг/мл (множественные сравнения, критерий Данна)

| № группы | Культура мононуклеаров: | Me \pm m | Q1 | Q3 |
|----------|--------------------------|------------------------|--------|---------|
| 1 | Спонтанная | 227,35 \pm 67,63 | 96,3 | 468 |
| 2 | ФГА | 887,15 \pm 128,9 * | 595,40 | 1167,10 |
| 3 | АГ <i>H. verbana</i> | 1315 \pm 451,7** | 562,6 | 2907,7 |
| 4 | АГ <i>H. medicinalis</i> | 1559,05 \pm 304,3** | 1018 | 2494,1 |
| 5 | АГ <i>H. orientalis</i> | 1416,35 \pm 665** | 423,6 | 2994,9 |
| 6 | АГ <i>E. fetida</i> | 209,65 \pm 68,23 *** | 103 | 460,9 |

Примечание: * – $p < 0,05$ в сравнении с группой 1,3,4,5,6; ** – $p < 0,05$ в сравнении с группами 1,2,6; *** – $p < 0,05$ в сравнении с группами 2,3,4,5.

При исследовании РБТЛ морфологическим методом в культурах были выявлены лимфоциты с нормальной морфологией, с признаками апоптоза и некроза (рис. 1). Показатели РБТЛ в спонтанных и митоген/антиген-стимулированных культурах мононуклеаров, представлены в таблице 2.

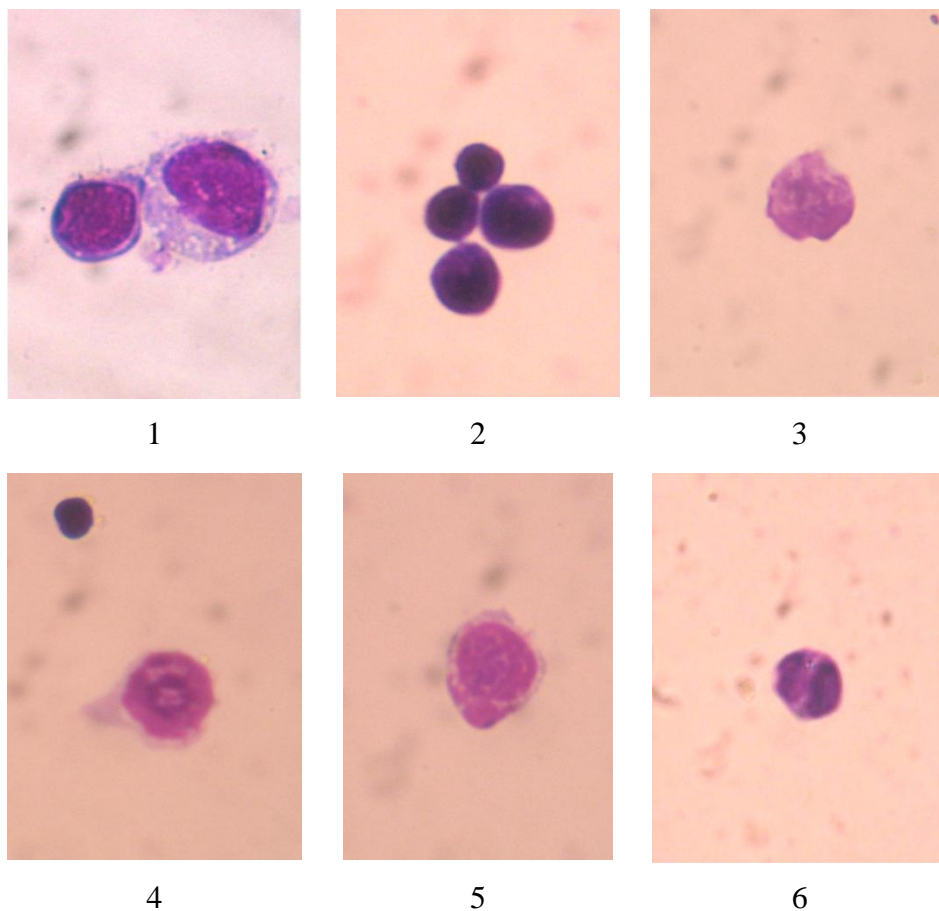


Рис. 1 Исследование РБТЛ морфологическим методом: лимфоциты с нормальной морфологией, с признаками апоптоза и некроза: 1. Митоген-стимулированная РБТЛ. 2. Антиген медицинской пиявки (АГМП) – стимулированная РБТЛ – норма РБТЛ и начало кариорексиса в двух нижних. 3. АГМП-стимулированная РБТЛ – некроз. 4. АГМП-стимулированная РБТЛ: вверху апоптоз – карио- и цитопикноз; внизу – апоптоз, перешедший в некроз. 5. АГМП-стимулированная РБТЛ – апоптоз: кариорексис, цейтозис плазмолеммы. 6. АГМП-стимулированная РБТЛ – abortивная форма РБТЛ, кариорексис с сохранением базофилии цитоплазмы.

Таблица 2 – Показатели РБТЛ (%) в спонтанной и митоген/антиген-стимулированной культурах мононуклеаров, представленные в виде медианы и ошибки медианы ($Me \pm m$). Использован критерий Данна.

| № группы | Культура мононуклеаров: | Общее количество клеток, подвергшихся бласттрансформации | Нормальная морфология клеток | Клетки с признакам и апоптоза | Клетки с признаками некроза |
|----------|--------------------------|--|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| 1. | Спонтанная | $6 \pm 0,59^{2,5,6}$ | $6 \pm 0,59^{2,5}$ | $0 \pm 1,06^{3,4,5,6}$ | $0 \pm 1,06^{3,5,6}$ |
| 2. | ФГА | $69,5 \pm 2,96^{1,3,4,5}$ | $69,5 \pm 2,96^{1,3,4,5,6}$ | $0 \pm 2,06^{3,4,5,6}$ | $0 \pm 2,06^{3,5,6}$ |
| 3. | АГ <i>H. verbana</i> | $11,65 \pm 1,02^{2,6}$ | $9,15 \pm 0,9^{2,6}$ | $1,5 \pm 0,2^{1,2}$ | $0,5 \pm 0,17^{1,2,6}$ |
| 4. | АГ <i>H. medicinalis</i> | $10,7 \pm 1,49^{2,6}$ | $9,35 \pm 1,29^{2,6}$ | $1,5 \pm 0,2^{1,2}$ | $0 \pm 0,19^6$ |
| 5. | АГ <i>H. orientalis</i> | $14,25 \pm 2,38^{1,2,6}$ | $11 \pm 2,35^{1,2,6}$ | $2 \pm 0,26^{1,2}$ | $0,5 \pm 0,15^{1,2,6}$ |
| 6. | АГ <i>E. fetida</i> | $40,75 \pm 5,49^{1,3,4,5}$ | $4 \pm 0,4^{2,3,4,5}$ | $3,5 \pm 0,5^{1,2}$ | $33,75 \pm 4,77^{1,2,3,4,5}$ |

Примечание: цифра в сноске соответствует номеру группы, с которой есть достоверное различие ($p < 0,05$).

Наибольшая интенсивность бластной трансформации лимфоцитов была выявлена в культурах мононуклеаров, стимулированных поликлональными митогенами ($p < 0,05$), при этом между показателями культур клеток, стимулированных АГ трёх видов МП, достоверных различий выявлено не было, хотя (среди них) уровень РБТЛ на АГ восточной пиявки был наивысшим и существенно отличался от данных контроля.

Большинство трансформированных в бласты лимфоцитов в культурах, стимулированных поликлональным митогеном (ФГА), имели нормальную морфологию клеток, тогда как среди лимфоцитов в культурах, стимулированных АГ ККЧ с нормальной морфологией, оказалось только 9,8%, а большая часть клеток (90,2%) имела признаки апоптоза (8,5%) и некроза (81,7%). При этом в других АГ-индуцированных культурах следует отметить относительно довольно значительное количество клеток в состоянии как апоптоза, так и некроза ($p < 0,05$ в сравнении с контролем), которые составляли до 14–17% от общего числа стимулированных лимфоцитов (при общем уровне РБТЛ от 10,7 до 14,25% – таких типов клеток 1,5–2,5%). Тогда как в культурах, стимулированных митогенами и в контроле, трансформированные лимфоциты с признаками апоптоза и некроза были практически единичны. Так, среди культур, стимулированных АГ МП, количество клеток с признаками апоптоза колебалось от $1,5 \pm 0,2$ до $2,0 \pm 0,26\%$, а с признаками некроза – от $0,0 \pm 0,19$ до $0,5 \pm 0,17\%$.

Таким образом, при проведении исследований выявлен достаточно высокий уровень синтеза ФНО- α культурами мононуклеаров, стимулированных АГ БАВ и тел исследуемых видов МП, который, превышает уровень ФНО- α при стимуляции лимфоцитов растительным поликлональным митогеном – ФГА. Следует отметить, что синтез ФНО- α достоверно не отличался друг от друга при стимуляции различными видами МП. Уровень синтеза ФНО- α , в основном, совпадает с полученными нами результатами бластной трансформации лимфоцитов и с аналогичными исследованиями синтеза интерлейкина- 1β в ответ на вышеуказанные АГ, которые были проведены нами ранее [12]. Считаем, что наши данные подтверждают связи синтеза ФНО- α с пролиферативной активностью лимфоцитов. Эти данные также согласуются с исследованиями, проведенными другими авторами у больных острым лейкозом, где была установлена четкая прямая связь между уровнем синтеза ФНО- α и прогрессированием заболевания [13,14].

Сегодня недостаточно изученным остаётся влияние АГ БАВ и тканей МП при проведении ГТ на иммунную систему и организм человека в целом. Существенная индукция синтеза ФНО- α мононуклеарами при стимуляции их АГ различных видов МП показывает наличие достаточно значимой антигенной реактивности, а достаточно высокие уровни апоптоза и некроза среди стимулированных форм мононуклеаров периферической крови говорят о том, что данные эффекты могут играть, по крайней мере отчасти, роль в формировании противовоспалительного действия БАВ МП [15].

Перспективным является дальнейшее изучение реактивности лимфоцитов на тканевые антигены и БАВ разных видов МП, используемых при ГТ, что позволит определить виды МП с наибольшей биологической активностью.

ВЫВОДЫ

1. Синтез ФНО- α стимулированными культурами мононуклеаров периферической крови доноров значительно превышает ($p < 0,05$) его спонтанные уровни (кроме культур стимулированных АГ ККЧ, для значений которых не было выявлено статистически значимой разницы с контролем), при этом в культурах, стимулированных АГ МП, синтез ФНО- α достоверно не отличается в зависимости от их видов.
2. Наибольшая интенсивность бластной трансформации лимфоцитов была выявлена в культурах мононуклеаров, стимулированных ФГА ($p < 0,05$), при этом между показателями культур клеток, стимулированных АГ трёх видов МП достоверных различий выявлено не было, хотя (среди них) уровень РБТЛ на АГ восточной МП был наивысшим и существенно отличался от контроля.
3. Показатели РБТЛ при стимуляции АГ ККЧ оказались достоверно выше ($p < 0,05$), чем в культурах клеток, стимулированных АГ МП, однако подавляющее большинство лимфоцитов (90,2%) имели признаки некроза. При этом в других АГ-индуцированных культурах следует отметить, относительно довольно значительное количество клеток в состоянии как апоптоза, так и некроза ($p < 0,05$ в сравнении с контролем), которые составляли до 14–17% от числа стимулированных.
4. Вышеуказанные результаты следует учитывать при анализе свойств БАВ и тканевых АГ различных видов МП, в том числе и при проведении ГТ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Нерянова Ю.Н. Опыт применения гирудотерапии в комплексном лечении головокружения у больных с дисциркуляторной энцефалопатией / Ю.Н. Нерянова, Л.В. Кузьменко // Украинський медичний альманах. – 2012. – № 15, № 3. – С. 136-138.
2. Карасева С.А. Гирудотерапия вновь популярна / С. А. Карасева // Фармацевт-практик. – 2004. – № 3. – С. 27-29.
3. Сочетанное применение коронатеры и гирудотерапии при рефлекторной стенокардии в пожилом возрасте [Электронный ресурс] / [Борисова О.Н., Живогляд Р.Н., Хадарцева К. А. и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 2012. – Т. 19, № 1. Режим доступа: <http://cyberleninka.ru/article/n/sochetannoe-primenenie-koronatery-i-girudoterapii-pri-reflektornoy-stenokardii-v-pozhilom-vozhraste>
4. 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.
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.) / [S. Utevsky, N. Kovalenko, K. Doroshenko et al.] // *Syst. Parasitol.* – 2009. – Vol. 74 (2). – P. 95-102.
8. FAT10 mediates the effect of TNF- α in inducing chromosomal instability / [Ren J., Wang Y., Gao Y. et al.] // *Journal of cell science.* – 2011. – Vol. 124, № 21. – P. 3665-3675.
9. Yoshimura T. Modulation of cytokine production from human mononuclear cells by several agents/ T. Yoshimura // *Yakugaku Zasshi.* – 2000. – Vol. 120, № 12. – P. 1277-1290.
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. Синтез интерлейкина-1 β культурами мононуклеаров, стимулированных растительным митогеном и антигенами кольцецов / [А.К. Фролов, А.С. Прилуцкий, Д.А. Лесниченко и др.] // *Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки.* – 2015. – № 1. – С. 140-148.
13. Плотникова С. В. Цитокины и молекулы межклеточной адгезии как маркеры системного воспаления при острых лейкозах [Электронный ресурс] / С.В. Плотникова, Г. Ш. Сафуанова // *Медицинский вестник Башкортостана.* – 2011. – № 6. – **Режим доступу:** <http://cyberleninka.ru/article/n/tsitokiny-i-molekuly-mezhkletочноy-adegezii-kak-markery-sistemnogo-vozpалeniya-pri-ostryh-leykozah>
14. Autocrine TNF- α production supports CML stem and progenitor cell survival and enhances their proliferation / [Gallipoli P., Pellicano F., Morrison H. et al.] // *Blood.* – 2013. – Vol. 122 (19). – P. 3335-3339.
15. Особенности реакции бластной трансформации лимфоцитов крови доноров стимулированной растительными лектинами и антигенами кольцецов / А.К. Фролов, Р.А. Литвиненко, В.В. Копейка, Е.Р. Федотов // *Проблемы экологии та медицини.* – 2012. – № 5-6. – С. 37-40.

REFERENCES

1. Nerjanova Ju. N. Опыт применения гирудотерапии в комплексном лечении головокружения у больных с дисциркуляторной яенцефалопатией / Ju.N. Nerjanova, L. V. Kuz'menko // *Ukrains'kij medichnij al'manah.* – 2012. – № . 15, № 3. – С. 136-138.
2. Karaseva S. A. Girudoterapija vnov' populjarna / S. A. Karaseva // *Farmacevt-praktik.* – 2004. – № 3. – С. 27-29.
3. Sochetannoe primenenie koronaterij i girudoterapii pri reflektornoj stenokardii v pozhilom vozraste [Elektronnij resurs] / [Borisova O. N., Zhivogljad R. N., Hadarceva K. A. i dr.] // *Vestnik novyh medicinskih tehnologij.* – 2012. – Т. 19. – № 1. **Режим доступу:** <http://cyberleninka.ru/article/n/sochetannoe-primenenie-koronaterij-i-girudoterapii-pri-reflektornoj-stenokardii-v-pozhilom-vozraste>
4. 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.
5. Kamenev O. Ju. Lechenie pijavkami: teorija i praktika girudoterapii: rukovodstvo dlja vrachej / O.Ju. Kamenev, A. Ju. Baranovskij. – SPb. : IG «Ves'», 2006. – 304 s.
6. Baskova I. P. Girudoterapija. Nauka i praktika / I.P. Baskova, G.S. Isahanjan. – М., 2004. – 508 s.
7. Chromosome numbers for three species of medicinal leeches (*Hirudo* spp.) / [S. Utevsky, N. Kovalenko, K. Doroshenko et al.] // *Syst. Parasitol.* – 2009. – Vol. 74 (2). – P. 95-102.

8. FAT10 mediates the effect of TNF- α in inducing chromosomal instability / [Ren J., Wang Y., Gao Y. et al.] // Journal of cell science. – 2011. – Vol. 124, № 21. – P. 3665-3675.
9. Yoshimura T. Modulation of cytokine production from human mononuclear cells by several agents/ T. Yoshimura // Yakugaku Zasshi. – 2000. – Vol. 120, № 12. – P. 1277-1290.
10. Pat. 80665 Ukraї'na, (51) MPK (2013.01), A61K 38/00 A61K 39/00. Sposib otrymannja antygeniv iz medychnoi p'javky / Frolov O. K., Lytvynenko R. O., Kopijka V. V., Fedotov Je. R.; vlasnyk Derzhavnyj vyshhyj navchal'nyj zaklad «Zaporiz'kyj nacional'nyj universytet» Ministerstva osvity i nauky, molodi ta sportu Ukraї'ny. – № 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. Sintez interlejkina-1 β kul'turami mononuklearov, stimulirovannyh rastitel'nyh mitogenom i antigenami kol'checov / [A. K. Frolov, A. S. Priluckij, D. A. Lesnichenko i dr.] // Visnik Zaporiz'kogo nacional'nogo universitetu. Biologichni nauki. – 2015. – № 1. – S. 140-148.
13. Plotnikova S. V. Citokiny i molekuly mezhkletочноj adgezii kak markery sistemnogo vospaleniya pri ostryh lejkozah [Elektronnij resurs] / S. V. Plotnikova, G. Sh. Safuanova // Medicinskij vestnik Bashkortostana. – 2011. – № 6. Режим доступа: <http://cyberleninka.ru/article/n/tsitokiny-i-molekuly-mezhkletочноj-adgezii-kak-markery-sistemnogo-vospaleniya-pri-ostryh-lejkozah>
14. Autocrine TNF- α production supports CML stem and progenitor cell survival and enhances their proliferation / [Gallipoli P., Pellicano F., Morrison H. et al.] // Blood. – 2013. – Vol. 122 (19). – P. 3335-3339.
15. Osobennosti reakcii blastnoj transformacii limfocitov krovi donorov stimulirovannoj rastitel'nymi lektinami i antigenami kol'checov / Frolov A. K., Litvinenko R. A., Kopejka V.V., Fedotov E.R. // Problemy ekologii ta medycyny. – 2012. – № 5-6. – S. 37-40.

УДК 612.172:[796.071.2:796.42]

ОСОБЛИВОСТІ ВАРІАБЕЛЬНОСТІ СЕРЦЕВОГО РИТМУ В СПОРТСМЕНІВ ІГРОВИХ ВИДІВ СПОРТУ ТА ЛЕГКОАТЛЕТІВ

Шевчук Т.Я., Романюк А.П.

*Східноєвропейський національний університет ім. Лесі Українки,
43025, Україна, Луцьк, просп. Воли, 13*

tetyana_shevchuk_2013@ukr.net,
romaniuk.alona@mail.ru

Вивчено особливості варіабельності серцевого ритму в спортсменів ігрових видів спорту та легкоатлетів. Встановлено, що в спортсменів ігрових видів спорту переважає посилення симпатичної регуляції, яка пригнічує активність автономного контуру, і цим засвідчує зростання активності центрального контуру управління. Спортсмени-легкоатлети характеризуються вищим рівнем тренуваності за показниками індексу напруженості регуляторних систем. У них виявлено статистично нижчі значення частоти серцевих скорочень, переважання парасимпатичних впливів механізмів регуляції серця. У спортсменів обох груп відмічали позитивні та негативні кореляційні взаємозв'язки між показниками варіабельності серцевого ритму.

Ключові слова: варіабельність серцевого ритму, спортсмени ігрових видів спорту, спортсмени-легкоатлети.

Шевчук Т. Я., Романюк А. П. ОСОБЕННОСТИ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ СЕРДЕЧНОГО РИТМА У СПОРТСМЕНОВ ИГРОВЫХ ВИДОВ СПОРТА И ЛЕГКОАТЛЕТОВ / Восточноєвропейский национальный университет им. Лесі Українки, 43025, Украина, Луцк, просп. Воли, 13.

Изучены особенности вариабельности сердечного ритма у спортсменов игровых видов спорта и легкоатлетов. Установлено, что у спортсменов игровых видов спорта преобладает усиление симпатической регуляции, которая подавляет активность автономного контура, и этим показывает рост активности центрального контура управления. Спортсмены-легкоатлеты характеризуются высоким уровнем тренированности по показателям индекса напряженности регуляторных систем. У них обнаружено статистически низкие значения частоты сердечных сокращений, преобладание парасимпатических влияний механизмов регуляции сердца. У спортсменов обеих групп отмечали положительные и отрицательные корреляционные взаимосвязи между показателями вариабельности сердечного ритма.