РОЗДІЛ ІІІ. ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН

УДК 577.2: 615. 811 : 612.112.9

ПРОЛІФЕРАТИВНА АКТИВНІСТЬ ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ НЕЛІНІЙНИХ САМИЦЬ ЩУРІВ, ЇХ ПРИПЛОДУ НА РАННІХ ЕТАПАХ ПОСТЕМБРІОНАЛЬНОГО РОЗВИТКУ НА ФОНІ ГІРУДОВПЛИВУ

Амінов Р. Ф.

Запорізький національний університет,
69900, Україна, Запоріжжя, вул. Жуковського, 66

91_amin_91@ukr.net

Проаналізовано проліферативну активність лімфоцитів у цільній крові за допомогою реакції бластної трансформації лімфоцитів (РБТЛ) у статевозрілих щурів та їхнього приплоду на фоні гірудологічного впливу. Дорослим статевозрілим самицям нелінійних щурів масою 150-200 гр два тижні до парування та два тижні після, робилися приставки по одній голодній медичній п’явці *Hirudo verbana* (Carena, 1820), щотижня масою 400 мг (4 приставки). Досліджували самиць після вигодовування приплоду, а також приплід у динаміці на 45 та 60-ту добу. Усіх тварин декапітували під ефірним наркозом. Рівень РБТЛ оцінювали морфологічним методом з урахуванням 300-400 лімфоцитів. У результаті дослідження у статевозрілих самиць щурів контрольної та дослідної груп тварин та у їхнього приплоду при стимуляції рослинним мітогеном та антигенами п’явки збільшується відсоток бластнотрансформованих клітин.

Ключові слова: гірудовплив, біологічно активні речовини, проліферація.

Aminov R. F. PROLIFERATIVE ACTIVITY OF BLOOD LYMPHOCYTES OF NONLINEAR RATS, THEIR OFFSPRING AT THE EARLY STAGES OF POST-EMBRYONIC DEVELOPMENT ON THE FOND / Zaporizhzhya National University; 69900, Ukraine, Zaporizhzhya, Zhukovsky str., 66

Nowadays, hirudotherapy, namely the treatment with medical leeches, is re-gaining momentum in the use with the prophylactic and therapeutic goal, because there are practically no diseases that can not be treated with leeches. Of the more than 200 kinds of leeches that live on the planet, only three types of medical leeches are most often used in treatment. Currently, medical leeches are grown on special biopharmic plants, after which they undergo surgical medical control. Leech is a single tool which eliminates patient infection diseases transmitted through blood. Hirudotherapy is a method of treatment that has no analogues in modern medicine. So, as now in the pharmacology more and more are shown by side effects from their use in the treatment of a number of diseases. Researchers are increasingly beginning to study and explore various natural-therapeutic methods of influencing the body of an animal and humans, one of which is hirudotherapy. In the saliva of a medical leech contain more than 100 substances that have many therapeutic effects. In the saliva of a medical leech contain more than 100 substances that have many therapeutic effects. Hirudotherapy and peptic salivary drugs are used effectively in medicine and in veterinary medicine. The main side effects of drugs are their negative effects on the proliferation of blood cells. Therefore, it is important to investigate the proliferative activity of lymphocytes by means of the reaction of blast transformation of lymphocytes in the whole blood of not only mature female rats, but also in their offspring against the background of hirudotherapy. Adult sexually mature female non-linear rats weighing 150-200 grams, two weeks prior to pairing and two weeks after, were prepared by one hungry medical leech Hirudo verbana (Carena, 1820), each week weighing 400 mg (4 consoles). Fixed animals using a fixing device. Animals were divided into two groups: the first experimental group of animals for the influence of biologically active substances Hirudo verbana; The second control group of animals without interference. The females were studied after feeding the offspring, as well as the growth in the dynamics at 45 and 60 days.

The proliferative activity of blood lymphocytes was evaluated in the whole blood by the reaction of blast transfection of lymphocytes (RBTL). Blood dissolved in 350 µl of heparin and adjusted to 2,5 ml of medium (1: 5): 50 ml of medium 199, 5 ml of 10 % embryonal calf serum, 15 mg of glutamine, 119 mg of Hepes, 50 µg / ml of gentamicin, 0,05 mM of 2 -mercaptoethanol. The mixture was poured into

penicillin vials and saturated with CO^2 pipettes. The culture mixture was introduced by mitogen – konkanavalin A (KonA, Germany) at a dose of 10 µg / ml. As antigens (AG), salt extract was used from bodies N. verbana Carena, 1820 at a dose of 5 µg / ml. The concentration of protein in the extract was determined by the Lowry method (Menshikov, 1987). The mitogenic stimulation of lymphocytes by plant lectin ConA was carried out to determine the conditionality of cell culture conditions, as well as to study the potential proliferative activity of the major populations of T-lymphocytes. The vials were sealed and cultured for 24 hours at a temperature of +37°. After 24 hours of cultivation, the samples were centrifuged (5 min at 1500 rpm), the culture supernatant was selected, and from the cell sieve, preparations were prepared, fixed with methanol, stained with Romanovsky-Gimza, followed by differentiation in acidified hydrochloric acid with distilled water. The level of RBTL was evaluated morphologically, taking into account 300 - 400 lymphocytes from the beginning of the brush to the basis of the drug. Statistical processing of data was carried out using the SPSS v.21,0 computer program. (IBM SPSS Statistics., USA). The sample parameters given in the table below have the following notation: X is the sample mean, SE is the standard error of the mean. The probability of differences between the average values was estimated according to the Student criterion. The differences were considered reliable at $p < 0,05$.

As a result of the study in mature females, scurries of the control and experimental groups of animals, when stimulated by plant mitogen and leech antigens, the percentage of blast cells increases $p < 0,05$ Comparing experimental with control groups of spontaneous cultures and stimulating vegetative mitogen almost did not differ from each other, with some the tendency to increase in the research group. And when stimulated by the AG, the experimental group significantly exceeded the figures in comparison with the control group, both in females and in their offspring, $p < 0,05$.

Blasters stimulated with plant lectin were typical, indicating a productive lymphogenesis. When stimulated by antigens, blastus had an underdeveloped cytoplasm and reduced its basophility, as a result of insufficient development of the protein-synthetic system.

Key words: hirudo influence, biologically active substances, proliferation.

ВСТУП

У наш час гірудотерапія (ГТ) – лікування за допомогою медичних п’явок (МП), знову набирає обертів у сучасній медицині тому, що практично немає захворювань, які не можна лікувати п’явками. Із понад 650 видів п’явок, які живуть на планеті, тільки три види МП найчастіше використовують із лікувальною метою: аптечну (*H. verbana* Carena, 1820), медичну/українську (*H. medicinalis* Linnaeus, 1758), рідше – східну п’явку (*H. orientalis* S. Utevsky et Trontelj, 2005). Зараз МП вирощують на спеціальних біофермах, після чого вони проходять суровий медичний контроль. П’явка є одноразовим інструментом, що виключає інфікування пацієнта хворобами, які передаються через кров [1-3]. Гірудотерапія – метод лікування, що не має аналогів у сучасній медицині. При медикаментозній терапії все частіше виявляють побічні дії від їх використання у лікуванні ряду захворювань [4, 5]. У наш час все більше приділяється увага різним натуротерапевтичним методам, які впливають на організм тварини та людини, одним із яких є ГТ. У складі слини МП містяться понад 100 речовин, які володіють багатьма терапевтичними ефектами [6-15]. ГТ та фармакологічні препарати на основі слини п’явки ефективно використовують і в медицині [7, 10-14], і у ветеринарії [6, 8, 9, 15]. Основним побічним ефектом лікарських засобів є їхній негативний вплив на проліферацію клітин крові, тому актуальним виявляються дослідження проліферативної активності лімфоцитів за допомогою реакції бластної трансформації лімфоцитів у цільній крові не тільки статевозрілих самиць щурів, а і у їхньому приплоді на фоні гірудовпливу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дорослим статевозрілим самицям нелінійних щурів масою 150-200 гр два тижні до парування та два тижні після робилися приставки по одній голодній медичній п’явці *Hirudo verbana* (Carena, 1820), щотижня масою 400 мг (4 приставки). Фіксували тварин за допомогою фіксувального пристрою [16]. Тварин розподіляли на дві групи: перша дослідна група тварин, яким робили приставки *Hirudo verbana*; друга контрольна група тварин без втручань. Досліджували самиць після вигодовування приплоду, а також приплід у динаміці на 45 та 60-ту добу постембріонального онтогенезу [17]. Експериментальні дослідження виконані з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист

хребетних тварин. Усього в експерименті використано 40 самок нелінійних щурів та 200 особин їхнього приплоду. Усіх тварин декапітували під ефірним наркозом. Брали кров, розведену гепарином 350 мкл, та доводили до 2,5 мл живильним середовищем (50 мл «Середовища 199», 5 мл 10 % ембріональної телячої сироватки, 15 мг глутаміну, 119 мг Hepes, 50 мкг/мл гентаміцину, 0,05 мМ 2-меркаптоетанолу). Розливали суміш у пеніцілінові флакони. У культуральну суміш вносили мітоген – конканавалін А (КонА, Німеччина) у дозі 10 мкг/мл. Як антигени (АГ) використовували сольову витяжку з тіл *H. verbana* Carena, 1820 у дозі 5 мкг/мл. Концентрацію білка в екстракті визначали за методом Лоурі. Культивували 24 години при температурі +37°. Через 24 години культивування зразки центрифугували (5 хв при 1500 об./хв), відбирали культуральний супернатант, а з осаду клітин готували препарати, фіксували метанолом, фарбували за Романовським-Гімзою. Рівень РБТЛ оцінювали морфологічним методом із урахуванням 300-400 лімфоцитів [18]. Активованими вважали: малі, середні та великі бласти. Лімфоцити з морфологічними ознаками апоптозу та некрозу в антигенстимульованих культурах відносили до активованих. Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою комп'ютерної програми SPSS v.21,0 (IBM SPSS Statistics, USA). Вибіркові параметри, наведені в таблиці, мають такі позначення: X – вибіркове середнє, SE – стандартна помилка середнього. Вірогідність відмінностей між середніми величинами оцінювали за критерієм Ст'юдента. Різниці вважали достовірними при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У статевозрілих самиць щурів значно збільшувався відсоток бластнотрансформованих лімфоцитів при стимуляції рослинним мітогеном та антигенами п'явки порівняно з спонтанними культурами, і в дослідній, і контрольній групах $p < 0,05$ (табл.1).

Таблиця 1 – Показники реакції бластної трансформації лімфоцитів крові щурів (X ± SE, n=20)

Тварини	Відносна кількість лімфоцитів, %	Група	Вид стимуляції лімфоцитів	Бластно-трансформовані лімфоцити, %
Статевозрілі самки	70,09 ± 1,48	Контроль	СП	9,40 ± 0,56
			КонА	27,01 ± 1,62*
			Антигени	37,80 ± 2,27*
	70,51 ± 1,64	Гірудовплив	СП	14,28 ± 0,86#
			КонА	29,67 ± 1,78*
			Антигени	41,18 ± 2,47*
60-та доба	86,68 ± 0,67	Контроль	СП	7,01 ± 0,42
			КонА	12,11 ± 0,73*
			Антигени	8,30 ± 0,50
	82,90 ± 2,00	Гірудовплив	СП	7,57 ± 0,45
			КонА	18,97 ± 1,14*,#
			Антигени	12,91 ± 0,77*,#
45-та доба	85,86 ± 1,36	Контроль	СП	4,01 ± 0,24
			КонА	12,10 ± 0,73*
			Антигени	5,04 ± 0,30
	81,40 ± 1,72	Гірудовплив	СП	10,40 ± 0,62#
			КонА	30,38 ± 1,82*,#
			Антигени	15,88 ± 0,95*,#

Примітки: СП – спонтанна РБТЛ (контроль), РБТЛ з лектином КонА, * – $p < 0,05$ показники, що достовірно відрізняються від СП, # – $p < 0,05$ показники, що достовірно відрізняються від контрольної групи.

Так, у контрольній групі на стимуляцію КонА зростання на 65,20 %, при АГ стимуляції на 75,13 %, а у дослідній групі КонА зростає на 51,87 %, при АГ стимуляції на 65,32 %. При дослідженні приплоду у контрольних групах значне підвищення на стимуляцію КонА $p < 0,05$, а при стимуляції антигенами, статистично не відрізнялась від спонтанних. При порівнянні груп між собою, у дослідної групи у всіх культурах крові, як у статевозрілих самках, так і у їх приплоду на всіх етапах розвитку значне збільшення бластнотрансформованих лімфоцитів порівняно з контрольною групою тварин $p < 0,05$. Збільшена реакція лімфоцитів на антигени п'явки *Hirudo verbana* у досліді вказують на їх поліклональну активацію, як і на рослинний лектин, що збігаються з іншими проведеними дослідами на щурах [19]. У досліді РБТЛ на АГ стимуляцію наближалися до показників, як на рослинному лектині КонА. РБТЛ морфологічно відрізнялися рис 1.

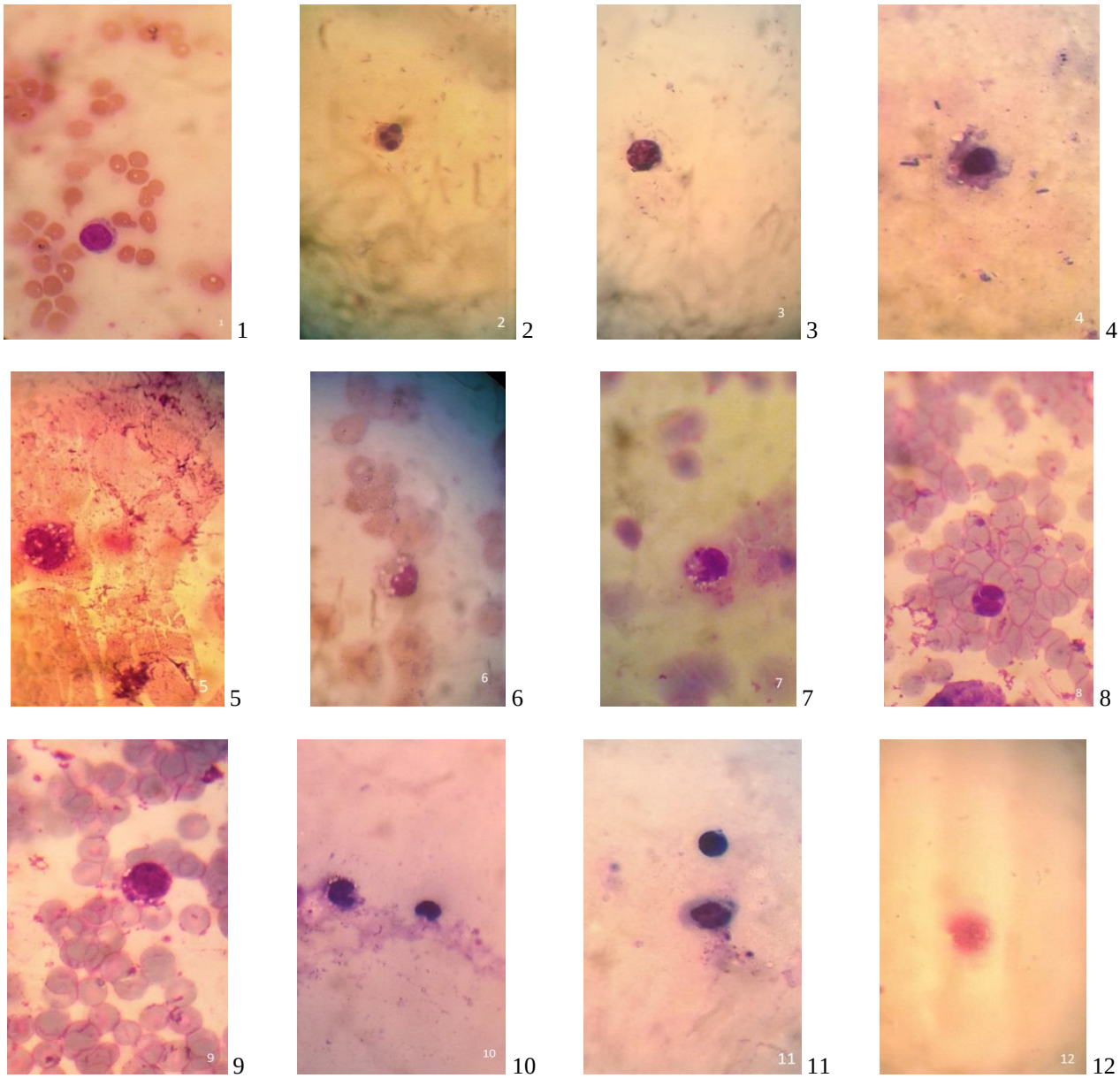

Рис. 1. Морфологічні форми бласттрансформованих лімфоцитів під впливом рослинного мітогену та антигенів *Hirudo verbana* (об'єктив 100×, забарвлення за Романовським-Гімзою). Типові бласттрансформовані лімфоцити під впливом: 1 – КонА. Бласттрансформовані лімфоцити під впливом антигенів *Hirudo verbana* із ознаками апоптозу: 2 – каріорексис ядра нейтрофілів; 3 – пікноз ядра, цейозис плазмолеми; 4 – пошкодження цілісності плазмолеми, вакуолізація цитоплазми; 5, 6 – вакуолізація цитоплазми та ядра; 7, 9 – вакуолізація цитоплазми; 8 – двудольне ядро; 10, 11 – пікноз ядра та цитоплазми; 12 – дифузне еозинофільне п'ятно.

Бласти стимульовані рослинним лектином, були типовими, що свідчило про продуктивний лімфогенез. При стимуляції антигенами бласти мали недостатньо розвинену цитоплазму та знижену її базофільність, як результат недостатнього розвитку білок-синтетичної системи.

У культурах, у які додавали антигени, деякі лімфоцити мали ознаки апоптозу.

У таких культурах також часто зустрічались некротичні лімфоцити у вигляді дифузних еозинофільних пятен. Апоптоз та некроз лімфоцитів може свідчити про протизапальну дію БАР п'явки.

Збільшення рівня РБТЛ в культурах, стимульованих АГ *Hirudo verbana* порівняно зі спонтанною РБТЛ, у контрольних тварин можна пояснити наявністю загальних патернів у білковій організації всіх видів. Формування імунної відповіді починається з взаємодії патернів з патерн-розрізняючими рецепторами клітин вродженого імунітету, які через клітинні контакти за допомогою цитокінів втягують в імуногенез лімфоцити [19]. Із цих позицій отримує логічне пояснення збільшення РБТЛ після ГТ, як результат збільшення в рециркуляції сенсибілізованих до АГ аптечної п'явки клітин, які мають спільні патерни з іншими видами [19]. Індукція апоптозу та некрозу клітин крові на АГ *Hirudo verbana*, ймовірно, є однією з форм їхньої імунологічної захисної реакції. Пристосування до ектопаразитизму та харчування МП до стерильного внутрішнього середовища господаря (копитні ссавці, людина) філогенетично знизило захисний цитотоксичний ефект до крові. Еволюційний перехід медичної п'явки до мутуалізму з копитними ссавцями сприяв адаптивному обмеженню захисних механізмів савців, шляхом наведення біологічно активними речовинами дозозалежного виборчого апоптозу імунокомпетентних клітин господаря, що проявляється у вигляді протизапального ефекту – основного терапевтичного механізму ГТ [20].

Перспективним та доцільним є подальше дослідження морфологічних показників імунологічних органів на фоні гірудологічного впливу.

ВИСНОВКИ

1. На фоні гірудологічного впливу при стимуляції цільної крові антигенами медичної п'явки значно збільшується відсоток бластних клітин, і в статевозрілих самицях щурів, і в їхнього приплоду. Показники РБТЛ на АГ стимуляцію наближалися до показників, як на рослинному лектині КонА. Так, у контрольній групі на стимуляцію КонА зростання на 65,20 %, при АГ стимуляції на 75,13 %, а в дослідній групі КонА зростає на 51,87 %, при АГ стимуляції на 65,32 %.
2. У спонтанних та стимульованих рослинним лектином культурах в основному відмічались продуктивні стадії імуногенезу, тоді як при стимуляції АГ часто зустрічали апоптичні реакції.
3. При дослідженні приплоду в контрольних групах значне підвищення на стимуляцію КонА $p < 0,05$, а при стимуляції антигенами, культура статистично не відрізнялась від спонтанних.
4. При порівнянні груп між собою, у дослідної групи у всіх культурах крові, значне збільшення бластнотрансформованих лімфоцитів порівняно з контрольною групою тварин $p < 0,05$.

ЛІТЕРАТУРА

1. Жаров Д. Г. Секреты гирудотерапии или как лечиться пиявками. Ростов н/Д : Феникс, 2003. 320 с.
2. Каменев О. Ю., Барановский А. Ю. Лечение пиявками: теория и практика гирудотерапии : руководство для врачей. Санкт-Петербург : ИГ Весь, 2006. 304 с.
3. Савинов В. А. Гирудотерапия : руководство. Москва : Медицина, 2004. 432 с.
4. До питання класифікації побічних реакцій лікарських засобів та підходів до їх диференціації (бібліографічний огляд) / О. В. Матвєєва, О. П. Вікторов, В. Є. Бліхар та ін. *Український медичний часопис*. 2011. № 2 (82). С. 78-84.

5. Солошенко Э. Н. Лекарственная болезнь в проблеме побочного действия лекарственных средств: современное состояние. Дискуссионные вопросы диагностики и лечениюю. *Международный медицинский журнал*. 2012. № 3. С. 80-88.

6. Влияние гирудотерапии на физиологические показатели у коз / А. Фролов, В. Копейка, Е. Федотов и др. *Тваринництво України*. 2010. № 7. С. 7-10.

7. Амінов Р. Ф., Фролов О. К. Вплив біологічно активних речовин сольовогоекстракту медичної п'явки на фагоцитарну активність нейтрофілів і цитоморфометричні зміни лімфоцитів крові людини у культурі. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*. 2015. Т. 7. С. 108-112.

8. Аминов Р. Ф., Фролов А. К., Федотов Е. Р. Влияние внутриутробной нагрузки биологически активными веществами солевого экстракта Hirudo verbana на морфометрические и гематологические показатели крыс на ранних этапах постэмбрионального развития. *Иммунопатология, Аллергология, Инфектология*. 2016. № 4. С. 6-11.

9. Амінов Р. Ф., Фролов О. К., Федотов Є. Р., Макєєва Л. В. Морфометричні показники тіла щурів на ранніх етапах постембріонального розвитку на фоні впливу антигенів сольового екстракту медичної п'явки в передембріональний і ембріональний періоди розвитку. *Вісник Запорізького національного університету: збірник наукових праць. Біологічні науки.* 2016. №1. С. 43-48.

10. Баскова И. П., Завалова Л. Л. Ингибиторы протеолитических ферментов медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*) (обзор). *Биохимия*. 2001. Т. 66. № 7. С. 869-883.

11. Abdullah, S. et al. Hirudotherapy. Leech therapy: applications and indications in surgery. *Archives of Clinical Experimental Surgery*. 2012.Vol. 1, № 3. P. 172-180.

12. Hildebrandt J. P., Lemke S. Small bite, large impact–saliva and salivary molecules in the medicinal leech, Hirudo medicinalis. *Naturwissenschaften.* 2011. Vol. 98, № 12. P. 995-1008.

13. Koeppen D., Aurich M., Rampp T. Medicinal leech therapy in pain syndromes: a narrative review. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 2014. Vol. 164. P. 95-102.

14. Pospelova, M. L., Barnaulov O. D. Effects of hirudotherapy on intravascular thrombosis activation in different groups of patients with cerebrovascular pathologies. *Aktuelnosti neurol, psihijatrije granicnih podrucja.* 2010. Vol. 18(3). P. 27-32.

15. Sobczak N., Kantyka M. Hirudotherapy in veterinary medicine. *Annals of Parasitology.* 2014. Vol. 60 (2). P. 89-92.

16. Пристрій для фіксації дрібних лабораторних тварин: патент 107289, України:МПК A61D3/00. № 201512710; заявл. 22.12.2015; опубл. 25.05.2016, Бюл. № 10. 6 с.

17. Западнюк И. П., Западнюк В. И., Захария Е. А., Западнюк Б. В. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. Київ: Вища школа, 1983. 383 с.

18. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / Беркало Л. В., Бобович О. В., Боброва Н. О. та ін. Полтава: Полімет, 2003. 320 с.

19. Фролов А. К., Литвиненко Р.А., Копейка В. В., Федотов Е. Р. Особенности реакции бластной трансформации лимфоцитов крови доноров стимулированной растительными лектинами и антигенами кольчецов. *Проблеми екології та медицини*. 2012. Т. 16. № 5-6. С. 37-40.

20. Фролов А. К., Литвиненко Р. А. Реакция бластной трансформации лимфоцитов крови больных, стимулированная растительными митогенами и антигенами кольчецов при гирудотерапии. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2014. № 3. С. 10-13.