

П.А. Ясницкого I степени за работу «Иммунные механизмы регуляции физиологических функций организма» (2004), премия им. основателей г. Екатеринбурга В.Н. Татищева и де Г.В. Генина в области науки, техники и медицины за работу «Разработка иммуногенетических подходов к диагностике, лечению и профилактике региональной патологии на примере Екатеринбурга» (2005).

Среди наград медаль «За трудовое отличие» за исследование комбинированных радиационных поражений (1981), золотая медаль ВДНХ СССР за исследования по теме «Спелеотерапия в калийном руднике» (1981), серебряная (2001) «За выдающийся вклад в разработку проблем общей патофизиологии и иммунопатологии» и золотая (2012) медали им. А.Д. Сперанского за выдающиеся заслуги в формировании новых научных направлений в области общей иммунологии и иммунопатофизиологии, а также активную роль в разработке государственной стратегии обеспечения экологической безопасности населения России, медаль им. В.В. Пашутина «За большой вклад в изучение экологической патофизиологии» (2003), серебряные медали РАЕН им. П.Л. Капицы за научные открытия (2001, 2003), почетный знак им. акад. РАМН В.И. Иоффе «За особый вклад в развитие иммунологии в России» (2004), золотая медаль Российского научного общества иммунологов «За выдающийся вклад в развитие иммунологии» (2004), медаль Физиологического общества им. И.П. Павлова «За заслуги и достижения в развитии физиологических наук» (2004), медаль «За вклад в развитие нанонауки и нанотехнологий» ЮНЕСКО (2010) и серебря-

ная медаль ЮНЕСКО «AVICENNA (Ибн-Сина) - 980-1037» (2011), золотая медаль Института общей патологии и патофизиологии РАМН им. А.Д. Сперанского «За выдающиеся достижения в области иммунопатологии и патофизиологии» (2012), нагрудный знак неправительственного экологического фонда имени В.И.Вернадского «Орден В.И. Вернадского» (2013), высшая научная награда УрО РАН - Золотая медаль им. акад. С.В. Вонсовского (2013).

Отмечен государственными наградами за заслуги перед государством, многолетний добросовестный труд и большой вклад в укрепление дружбы и сотрудничества между народами орденом «Дружбы» (1998) и орденами «За заслуги перед Отечеством» IV степени (2004) и III степени (2013). Имеет благодарность Президента РАН за многолетнюю и плодотворную работу в Академии на благо науки (1999) и почетную грамоту РАМН «За плодотворный труд по развитию медицинской науки и здравоохранения» (2004). Победитель конкурса ведущих научных школ 2005-2012 гг. Лауреат 2-х премий Правительства Российской Федерации: в области науки и техники за комплексные исследования по теме: «Разработка и внедрение системного экологического мониторинга как компонента стратегической безопасности» (2006) и в области образования «Создание и внедрение учебных и научно-практических изданий по иммунологии в систему высшего образования Российской Федерации» (2012). Имеет благодарности от президента РФ, правительства РФ, Совета Федерации, руководителей ряда федеральных округов, губернаторов, мэров РФ, национальных академий.

Редколлегия журнала «Имунопатология, аллергология, инфектология» сердечно поздравляет Валерия Александровича с Юбилеем, желает крепкого здоровья, счастья и новых успехов в научной и организаторской деятельности

УДК: 577.27:[615.811:612.112]

Реакция бластной трансформации лимфоцитов крови больных, стимулированная растительными митогенами и антигенами кольцецов при гирудотерапии

А.К. Фролов, Р.А. Литвиненко

ГВУЗ «Запорожский национальный университет» Министерства образования и науки Украины, ул. Жуковского, д. 66, г. Запорожье, ГСП-41, 69600, Украина

Reaction of patients' lymphocytes' blast-transformation in blood, stimulated by plant mitogens and annelid antigens at hirudotherapy

A.K. Frolov, R.A. Litvinenko

Zaporizhzhia national university, Zhukovskogo str, 66 bld., Zaporizhzhia, 69600, Ukraine

Аннотация

Исследовали влияние растительных митогенов, а также антигенов солевой вытяжки медицинских пиявок (*Hirudo verbana*, *H. medicinalis*, *H. orientalis*) и красного калифорнийского червя (*Eisenia fetida*) на реакцию бластной трансформации лимфоцитов периферической крови здоровых доноров и больных до и после курса гирудотерапии. Выявили различия действия трёх видов пиявки у здоровых доноров и больных. Курс гирудотерапии оказывает иммуностропное воздействие на организм человека, что проявляется повышением потенциальной пролиферативной способности лимфоцитов при тестировании в культуре. Антигены пиявки и красного калифорнийского червя ведут в большинстве случаев к апоптотическим и некротическим реакциям лимфоцитов. Наибольший уровень бласттрансформации лимфоцитов выявлен в культурах с добавлением антигенов *H. orientalis* и *Eisenia fetida*, не зависимо от гирудотерапии.

Ключевые слова

Реакция бластной трансформации лимфоцитов, гирудотерапия, медицинская пиявка, антигены, митогены

Гирудотерапия (ГТ) в настоящее время все больше пользуется успехом у населения благодаря ее лечебно-профилактической эффективности при хронических формах заболеваний, коррекции геронтологических признаков и др. [1, 2]. При питании медицинская пиявка впрыскивает в сосательную лауну вместе с секретом слюнных желез более 100 компонентов биологически активных веществ в оптимальной дозировке и последовательности, а

Summary

Investigated the effects of plant mitogens and antigens from salt extraction of medicinal leeches (*Hirudo verbana*, *H. medicinalis*, *H. orientalis*) and red Californian worms (*Eisenia fetida*) on the reaction of peripheral lymphocytes' blast-transformation in blood of healthy donors and patients before and after the course hirudotherapy. Demonstrated a difference action of three species leeches in healthy donors and patients. A course of hirudotherapy provides immunotropic effect on the human body that is manifested by increased potential lymphocyte proliferative capacity when tested in culture. Antigens of leeches and red Californian worms in the majority lead to apoptotic and necrotic responses of lymphocytes. The highest level of lymphocytes' blast-transformation was detected in cultures with antigens of *H. orientalis* and *Eisenia fetida*, irrespective of hirudotherapy.

Keywords

Reaction of lymphocyte blast-transformation, hirudotherapy, medicinal leech, antigens, mitogens

дозированное кровозвлечение способствует благоприятному перераспределению циркулирующей крови и лимфы, что в совокупности обеспечивает общее гомеостатическое действие [2]. Вместе с тем среди широкого спектра терапевтического действия ГТ, ее иммуностропное влияние мало изучено. Не решен также вопрос об идентичности биологически активных веществ различных видов медицинской пиявки, которых чаще всего используют для ГТ

целей. Поэтому цель работы — изучить влияние антигенов (АГ) трех видов медицинской пиявки: аптечной (*Hirudo verbana*, Carena, 1820), медицинской/украинской (*H. medicinalis*, Linnaeus, 1758), восточной (*H. orientalis*, S. Utevsky et Trontelj, 2005), а также красного калифорнийского червя (*Eisenia fetida*, Savigny, 1826) на реакцию бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ) в процессе ГТ.

Материалы и методы исследования

Исследована венозная кровь 22 условно здоровых женщин (средний возраст — $29,3 \pm 1,99$ лет) интактных по отношению к медицинской пиявке и 25 больных (13 женщин и 12 мужчин, средний возраст — $52,0 \pm 2,55$ лет) с различной хронической патологией в стадии ремиссии, стабилизированная кристаллическим гепарином (200 мкг/мл, Спофа) до и после амбулаторного курса ГТ, продолжительностью 3,5 - 4 недели, при котором было приставлено 25 - 35 голодных аптечных пиявок.

Лимфоциты, выделенные из венозной крови на градиенте плотности фиколл-верографина ($\rho=1,078$) [3], суспензировали в питательной среде (среда 199, 20% ЭТС, 20 мМ NERES, 0,3 мг/мл глутамин, 0,15 мг/мл аспарагина, 100 мкг гентамицина, 10 мМ 2-меркаптоэтанола), при конечной концентрации 2 млн/мл, культуру вносили по 0,25 мл в плоскодонные микропробирки объемом 2 мл. Ставили следующие виды РБТЛ: спонтанную (контроль), митоген-стимулированную — добавление 20 мкг/мл фитогемагглютинина (Болгария), 20 мкг/мл конканавалина А (Германия), АГ-стимулированную — добавление АГ 125 мкг/мл в пересчете на белок из солевой вытяжки трёх видов медицинской пиявки: аптечной, украинской, восточной и красного калифорнийского червя (для филогенетического сравнения). Водно-солевой экстракт из тел кольцецов получали согласно методу [4]. Лимфоциты культивировали 24 часа при температуре 37°C , после чего готовили мазки, окрашивали по Паппенгейму. РБТЛ оценивали морфологическим методом с учетом 500 - 600 лимфоцитов. За активированные принимали: малые, средние, большие бласты и лимфоциты с явными признаками апоптоза (цейозис плазмолеммы, вакуолизация ядра и цитоплазмы, кариорексис ядра) [5].

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью пакета прикладных программ SPSS v. 20,0. Проверка данных на нормальность распределения осуществлялась с использованием одновыборочного теста Колмогорова-Смирнова, в случае нормального распределения статистическую значимость разницы между исследуемыми группами оценивали по критерию Стьюдента. Значения в таблицах пред-

ставлены в виде $M \pm m$, где M — среднее значение признака, m — средняя ошибка среднего арифметического. Достоверными считали различия результатов при $P > 95\%$, $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Индивидуальные и средние показатели РБТЛ обследованных людей представлены в Табл. 1.

Количество спонтанно стимулированных лимфоцитов у интактных к биологически активным веществам кольцецов доноров (контроль) в среднем составляло $5,5 \pm 0,47\%$, а у больных до ГТ было несколько выше ($6,7 \pm 0,67\%$), что обусловлено различным состоянием исходной активации лимфоцитов в данном образце крови, которые её завершают в условиях культуры. Уровни РБТЛ на фитогемагглютинин и конканавалин А у обследованных контингентов лиц также совпадали с данными других авторов [6], что свидетельствует о кондиционности условий культивирования лимфоцитов. Особенности РБТЛ связаны в основном со специфичностью реагирования лимфоцитов на АГ кольцецов. Так, у интактных доноров уровни РБТЛ превышали их контрольные (спонтанные) значения в 2 - 3 раза для АГ медицинской пиявки с тенденцией их увеличения в культурах с АГ украинской и восточной пиявки и около 8 раз для АГ красного калифорнийского червя. У больных до ГТ, которые также ранее не имели контактов с медицинской пиявкой, уровни РБТЛ были выше их спонтанных значений, аналогично донорам. При этом нами обнаружен факт морфологических отличий РБТЛ на растительные митогены (фитогемагглютинин, конканавалин А) и АГ кольцецов. В митоген-стимулированных культурах лимфоцитов наблюдались типичные бласты с синтетически активным ядром и базофильной цитоплазмой, что свидетельствует о продуктивном лимфогенезе, который при пролонгированном культивировании на 2 - 3 сутки завершался бы митозом. При стимуляции АГ кольцецов бласты имели недостаточно развитую базофильную цитоплазму, значительная их часть была с признаками апоптоза (Рис. 1, 2). В таких культурах также часто встречаются некротические лимфоциты в виде диффузных эозинофильных пятен. Перечисленные признаки, более часто встречались в культурах стимулированных АГ красного калифорнийского червя.

После ГТ стимулирующий ее эффект проявился во всех культурах. Увеличились спонтанная и митоген-стимулированная РБТЛ, как показатель потенциальной пролиферативной активности лимфоцитов. В 2 - 2,5 раза от исходного уровня увеличилась РБТЛ и в АГ-стимулированных культурах. При этом на специфические АГ кольцецов продолжала

Таблица 1. Митоген- и АГ-стимулированная РБТЛ крови доноров и больных до и после ГТ, %

Группы обследованных	Уровни стимуляции лимфоцитов, %						
	СП	ФГА	КонА	АП	УКР	ВОСТ	ККЧ
Контроль, n=22	5,5±0,47	67,7±2,36	38,9±2,10	11,4±0,81 / 1,98±0,264	12,0±1,18 / 2,00±0,221	15,8±1,89 / 2,57±0,249	49,4±4,38
Больные до ГТ, n=25	6,7±0,67	64,3±1,71	36,2±1,71	12,0±1,04 / 2,30±0,135	13,2±0,75 / 2,72±0,185*	15,2±1,09 / 2,92±0,172	36,5±2,33*
Больные после ГТ, n=25	18,5±1,04Δ,*	70,9±1,43Δ	41,4±1,48Δ	24,8±0,72Δ,* / 4,70±0,132Δ,*	27,3±1,31Δ,* / 5,18±0,173Δ,*	35,3±1,59Δ,* / 5,60±0,115Δ,*	61,4±3,21Δ,*

Примечание: СП – спонтанная РБТЛ (контроль), ФГА – фитогемагглютинин, КонА – конканавалин А, АП – АГ аптечной пиявки, УКР – АГ украинской пиявки, ВОСТ – АГ восточной пиявки, ККЧ – АГ красного калифорнийского червя; в числителе – общее количество бласттрансформированных лимфоцитов в культуре клеток; в знаменателе – в том числе с признаками апоптоза, число некротических клеток в таблице отдельно не указано; * – различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,05$; Δ – различия между группой до ГТ и после ГТ достоверны при $p < 0,05$.

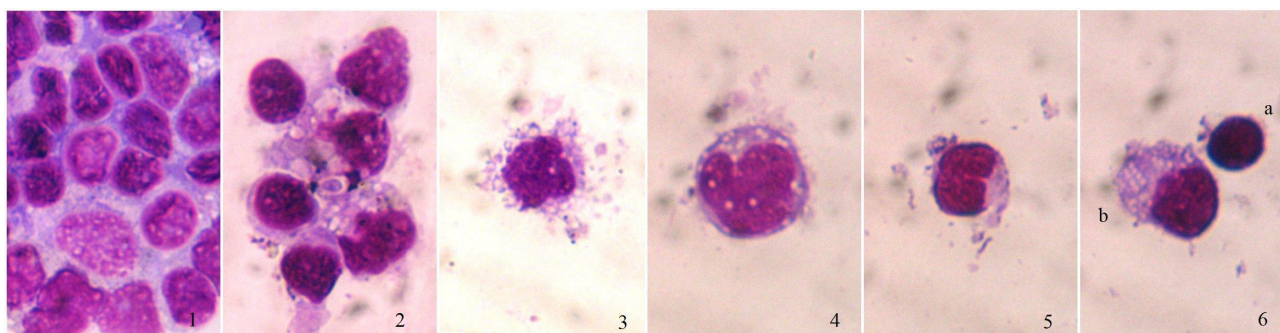


Рис. 1. Морфологические формы бласттрансформированных лимфоцитов под влиянием растительных митогенов и АГ колец (объектив 100Ч, окраска по Паппенгейму). Типичные бласттрансформированные лимфоциты под влиянием 1) фитогемагглютинаина, 2) конканавалина А; бласттрансформированные лимфоциты под влиянием АГ колец с признаками апоптоза: 3) повреждение целостности плазмолеммы, вакуолизация ядра; 4) вакуолизация цитоплазмы и ядра; 5) деформация ядра – двудольчатое ядро, формирование псевдоподий; 6) а – пикноз ядра, цейозис плазмолеммы, b – вуалевидная цитоплазма с вакуолизацией.

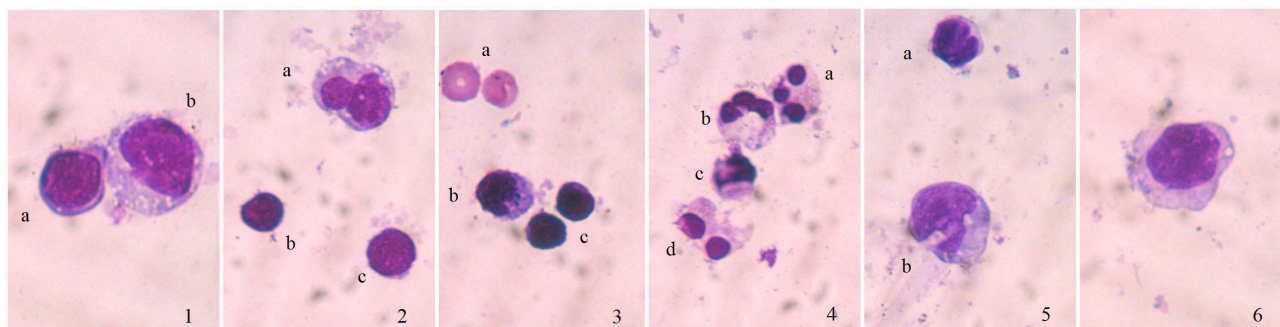


Рис. 2. Продолжение: апоптотические формы бласттрансформированных лимфоцитов под влиянием АГ колец (объектив 100Ч, окраска по Паппенгейму): 1) а – вакуолизация цитоплазмы, b – формирование псевдоподий, вакуолизация ядра и цитоплазмы; 2) а – вакуолизация цитоплазмы, вакуолизация и кариорексис ядра, b, c – пикноз ядра; 3) а – эритроциты, b – лимфоцит с фрагментацией ядра и микроядрами, c – пикноз ядра и цитоплазмы; 4) а, b, d – кариорексис ядра нейтрофилов, c – кариорексис с признаками кариолиза ядра лимфоцита; 5) а – двудольчатое ядро, b – ядро с единичной протрузией, кариорексис ядра лимфоцитов; 6) вакуолизация цитоплазмы лимфоцита.

преобладать непродуктивная стадия иммуногенеза, которая переходила в апоптоз и некроз. В культурах, стимулированных АГ медицинской пиявки, отмечен факт доминирования РБТЛ с АГ восточной пиявки, тогда как ГТ проводили аптечной. Обращает на себя внимание высокий уровень РБТЛ на АГ

красного калифорнийского червя, который после ГТ приближался к фитогемагглютинин-стимулированной культуре, но отличался преобладанием апоптотических и некротических реакций.

Увеличение уровня РБТЛ в культурах, стимулированных АГ колец по сравнению со спонтан-

ной РБТЛ, у интактных доноров, а также больных до и после ГТ, можно объяснить наличием общих паттернов в белковой организации всех видов. Формирование иммунного ответа начинается со взаимодействия паттернов с паттерн-распознающими рецепторами клеток врожденного иммунитета, которые через клеточные контакты и с помощью цитокинов вовлекают в иммуногенез лимфоциты [7]. С этих позиций получает логическое объяснение также факт увеличения РБТЛ после ГТ, как результат увеличения в рециркуляции сенсibilизированных к АГ аптечной пиявки клеток имеющих общие паттерны с другими видами. Вместе с тем различные уровни РБТЛ подтверждают, что это различные виды. Ранее установлено наличие сходства состава белков и пептидов секрета слюнных желез этих трёх видов пиявок на 30 - 40 %, при этом наибольшая близость наблюдается между *H. medicinalis* и *H. orientalis* [8]. Различные уровни РБТЛ на АГ аптечной, украинской и восточной пиявок подтверждают видовые различия продукции биологически активных веществ. Повышение уровней РБТЛ на АГ трёх видов пиявки после курса ГТ аптечным видом указывает на сходство их биологически активных веществ.

Обнаруженная нами активация АГ кольцецов иммуногенетической реакции лимфоцитов по непродуктивному пути в культуре является новым, ранее не описанным их свойством. Индукция апоптоза и последующего некроза клеток крови хозяина-прокормителя АГ кольцецов, вероятно, является одной из форм их иммунологической защитной реакции. При этом его наибольший эффект проявляется у красных калифорнийских червей, как у организмов, живущих в почве с избытием микроорганизмов. Приспособление к эктопаразитизму и питанию относительно стерильной внутренней средой хозяев-прокормителей (копытные млеко-

питающие, человек) филогенетически значительно снизили защитный цитотоксический эффект АГ у медицинской пиявки. Эволюционный переход медицинской пиявки к мутуализму с водопойными копытными млекопитающими (филогенетические хозяева-прокормители) способствовал адаптивному ограничению защитных механизмов у последних, путём наведения биологически активными веществами дозозависимого избирательного апоптоза иммунокомпетентных клеток хозяев, что проявляется в виде противовоспалительного эффекта — основного терапевтического механизма ГТ.

Таким образом, впервые обнаруженное нами разнообразие РБТЛ в культурах, стимулированных АГ разных видов медицинской пиявки и красного калифорнийского червя, является основанием для экспериментального изучения иммуотропного действия биологически активных веществ кольцецов и клинического обоснования ГТ.

Выводы

1. Уровни РБТЛ в культурах, стимулированных АГ медицинской пиявки, превышали их спонтанные значения в 2 – 2,5 раза, а в культурах, стимулированных антигенами красного калифорнийского червя — в 8 раз и после ГТ ещё в несколько раз увеличились во всех видах культур.
2. В спонтанных и митоген-стимулированных культурах наблюдались преимущественно продуктивные стадии иммуногенеза в виде типичных бластов, в стимулированных АГ кольцецов — апоптотические и некротические реакции.
3. Увеличенные значения РБТЛ в культурах, стимулированных АГ кольцецов в условно здоровых донорах и больных до ГТ, по сравнению со спонтанными значениями, связаны с наличием в их биополимерах общих паттернов.

Литература

1. Баскова И. П., Исаханян Г. С. Гирудотерапия. Наука и практика. М.: 2004. 508 с.
2. Каменев О. Ю., Барановский А. Ю. Лечение пиявками: теория и практика гирудотерапии: руководство для врачей. СПб.: ИГ «Весь», 2006. 304 с.
3. Лимфоциты: Методы ; пер. с англ. Под ред. Дж. Клауса. М.: Мир, 1990. 395 с.
4. Пат. 80665 Україна, (51) МПК (2013.01), А61К 38/00 А61К 39/00. Фролов О.К., Литвиненко Р.О., Копійка В.В., Федотов Є.Р. Спосіб отримання антигенів із медичної п'явки. Власник Державний вищий навчальний заклад «Запорізький національний університет» Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України. №ч 2012 13751; заявл. 03.12.2012; опубл. 10.06.2013. Бюл. №11.
5. Theml H., Diem H., Haferlach T. Color atlas of hematology. Practical microscopic and clinical diagnosis. 2nd edition. NY: Thieme Stuttgart, 2004. 208 p.
6. Назаренко Г. И., Кишкун А. А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. М.: Медицина, 2000. 544 с.
7. Дранник Г. Н., Дранник А. Г. Клиническая иммунология и аллергология: пособие. 5-е изд., доп. К.: Полиграф-плюс, 2011. 561 с.
8. Baskova I. P., Kostjukova E. S., Vlasova M. A. [et al.] Proteins and peptides of the salivary gland secretion of medicinal leeches *Hirudo verbana*, *H. medicinalis*, and *H. orientalis*. Biochemistry (Moscow). 2008; 73 (3): 315–320.

Сведения об авторе:

Фролов Александр Кириллович. Украина, г. Запорожье, ул. Героев Сталинграда, 50-77. тел. +38 (061)2891212, +38 (061)2287508 (факс), E-mail: a_frolov@ukr.net

Поступила 03.09.2014 г.