

УДК 616.419:613:616.419

Р.Ф. Амінов^{1*}, О.К. Фролов¹, А.С. Амінова¹, Л.В. Макєєва²

Оцінка мітотичної активності кісткового мозку за умов короткострокового гіпотермічного впливу

UDC 616.419:613:616.419

R.F. Aminov^{1*}, O.K. Frolov¹, A.S. Aminova¹, L.V. Makyeyeva²

Evaluation of Mitotic Activity of Bone Marrow Under Short-Term Hypothermia

Реферат: У роботі досліджено мітотичну активність кісткового мозку за умов гірудологічного та короткострокового гіпотермічного впливу. Зроблено порівняння показників мітотичного індексу кісткового мозку під час негайного обстеження вилученого з тіла стегна та за умов короткострокового гіпотермічного впливу. В результаті порівняння не виявлено статистичних розбіжностей між рівнями показників мітотичного індексу під час негайного обстеження та за умов короткострокового гіпотермічного впливу в інтактних щурів і тварин після гірудологічного впливу. Це свідчить про гіпотермальну фіксацію вихідного рівня даного показника, збереженість фізіологічного стану біомембран до гіпотонічного шоку та морфологічної структури клітин. Використаний у роботі короткостроковий гіпотермічний вплив на клітини кісткового мозку може бути доданий до багатопротинного алгоритму лабораторного аналізу під час вивчення мітотичного індексу в активно проліферувальних клітинах.

Ключові слова: гіпотермія, мітотичний індекс, кістковий мозок, гірудологічний вплив, активно проліферувальні клітини.

Abstract: In this research, we have studied the mitotic activity of bone marrow when applying medicinal leeches and short-term hypothermia. The bone marrow mitotic indices were compared within an immediate examination of the thigh removed from the body and during a short-term hypothermia. As a result, no statistical differences were found between the mitotic levels during immediate examination and a short-term hypothermia in the intact animals and those after medicinal leech application, that evidenced to a hypothermal fixation of initial level of this index, preservation of biomembrane physiological state prior to hypotonic stress and cell morphology. The used here short-term hypothermia on bone marrow cells may be included in the multi-profile algorithm of laboratory analysis when studying a mitotic index in actively proliferating cells.

Key words: hypothermia, mitotic index, bone marrow, medicinal leech application, actively proliferating cells.

Кістковий мозок (КМ) є невід'ємною частиною організму, який виконує низку важливих функцій, тому дослідження його показників під впливом різних факторів має велике значення. Протягом усього життя щурів КМ є основним органом гемопоезу [1, 2, 13]. Його частка становить близько 3% від маси тіла дорослого щура [3, 7, 9–11]. Проліферативні зміни в КМ впливають на екзогенні чи ендогенні чинники та показники формених елементів периферичної крові. Комплексне дослідження КМ і формених елементів крові дозволяє детально проаналізувати динаміку ефективності будь-якого експериментального впливу в дослідях на щурах [13, 14, 18, 19]. Під час вивчення мітотичного індексу КМ необхідно враховувати швидкий перебіг фаз мітозу, що примушує застосовувати спеціальні прийоми (наприклад, вплив низьких температур) для їх фіксації на момент обстеження, а також використовувати гіпотонічний шок у даному методичному обстеженні, що потребує забезпечення збере-

The bone marrow (BM) as an integral part of the body performs a number of vital functions. Hence, studying its parameters under the impact of various factors is crucial. The BM is the main hematopoietic organ throughout the lifespan of rats [5, 6, 12]. Its proportion is about 3% of adult rat's body weight [2–4, 7, 8]. Proliferative changes in BM affect both exogenous or endogenous factors and indices of peripheral blood cell count. A comprehensive study of BM and blood cell count enables a detailed analysis of the efficiency dynamics of any experimental exposure in rats [12, 13, 18, 19]. When studying the mitotic index in BM, a rapid progression of mitotic phases should be borne in mind. It requires using the special techniques (*e. g.*, low temperature impact) to fix them at the moment of examination, as well as to apply a hypotonic shock in this methodological examination to ensure the preservation of functional state of cell biological membranes.

¹ Запорізький національний університет, Запоріжжя, Україна

² Запорізький державний медичний університет, Запоріжжя, Україна

¹ Zaporizhzhia National University, Zaporizhzhia, Ukraine

² Zaporizhzhia State Medical University, Zaporizhzhia, Ukraine

***Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**

вул. Жуковського, 66, м. Запоріжжя, Україна 69600;
тел.: (+38 066) 137-43-91
електронна пошта: 91_amin_91@ukr.net

***To whom correspondence should be addressed:**

66, Zhukovsky str., Zaporizhzhia, Ukraine 69600;
tel.: +380 66137 439
e-mail: 91_amin_91@ukr.net

Надійшла 22.03.2021

Прийнята до друку 18.05.2022

Received 22, March, 2021

Accepted 18, May, 2022

© 2022 R.F. Aminov, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ження функціонального стану біологічних мембран клітин.

Гірудологічний вплив (ГВ) часто застосовується у якості моделі природного фармацевтичного засобу. Він ефективний під час стимуляції гістогенезів тканин, зокрема і гемопоетичних. У медицині ГВ широко використовується для профілактики та лікування великої кількості захворювань: серцево-судинних, безпліддя, вірусних, варикозних, хірургічних ран, туберкульозу, раку [15, 17, 20]. У ветеринарії використання медичних п'явок може сприяти активації імунної системи організму, відновленню функції печінки, лікуванню вірусних захворювань, маститів, ендометритів, артритів тощо [6, 15, 16].

Мета дослідження — оцінка мітотичної активності кісткового мозку щурів після гірудологічного та короткострокового гіпотермічного впливу протягом години за температури (6 ± 2)°C.

Матеріали і методи

Робота була виконана на 7–8-місячних нелінійних білих самцях щурів виду *Rattus norvegicus* масою 250–270 г ($n = 40$). Для дослідження використовували тварин, які пройшли карантинний режим і не мали зовнішніх проявів захворювання. Маніпуляція з тваринами проводилася згідно з рішенням Комітету з біоетики біологічного факультету Запорізького національного університету МОН України (протокол № 1 від 22 березня 2018 р.) з дотриманням регламентованих норм і правил поводження з лабораторними тваринами: принципів біоетики, законодавчих актів і вимог відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних досліджень та інших наукових цілей», а також Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Усіх тварин було розділено на групи ($n = 20$ у кожній): 1 — інтактні щури; 2 — щури після ГВ. В обох групах формували по 2 підгрупи тварин, у яких негайно обстежували КМ в умовах температури тіла і після короткострокового гіпотермічного впливу протягом години за температури (6 ± 2)°C.

Гірудологічний вплив. Кожного тижня на куприкову ділянку (всього 4 рази) тваринам ставили по одній медичній п'явці *Hirudo verbena* масою 0,9–1,1 г.

У щурів груп 1 та 2 вивчали показники мітотичної активності клітин кісткового мозку та периферичної крові.

Отримання периферичної крові та досліджувані показники. Після виводу тварин з експе-

The medicinal leech application (MLA) is frequently used as a model of natural pharmaceutical mean. It is efficient in stimulating the tissue histogenesis, including the hematopoietic ones. In medicine, the MLA is widely used to prevent and treat a huge number of diseases such as cardiovascular diseases, infertility, viral diseases, varices, surgical wounds, tuberculosis, cancer [14, 17, 20]. In veterinary medicine, the use of medicinal leeches may activate the body's immune system, recovery of liver function, successful treatment of viral diseases, mastitis, endometritis, arthritis, etc. [14–16].

The research aim herein was to assess the mitotic activity of rat bone marrow after medicinal leech application and a short-term hypothermia for an hour at (6 ± 2)°C.

Materials and methods

The research was performed in 7–8-month-old outbred *Rattus norvegicus* white male rats weighing 250–270 g ($n = 40$). Animals after the quarantine regime and with no external manifestations of the disease were used in this study. Manipulation with animals was carried out in accordance with the decision of the Bioethics Committee of the Faculty of Biology of Zaporizhzhia National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine (protocol No. 1 of March 22, 2018) in compliance with the regulated norms and rules for handling laboratory animals: the principles of bioethics, legislative norms and requirements in accordance with the statements of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes, as well as the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty'.

All animals were divided into groups ($n = 20$ in each): the Group 1 comprised the intact rats; in the Group 2 were the animals after MLA. In both groups, 2 subgroups of animals were formed, where the bone marrow was analyzed immediately at body temperature and after 1-hour short-term hypothermia at (6 ± 2)°C.

Medicinal leech application. Every week, one medicinal leech *Hirudo verbena* weighing 0.9–1.1 g was applied to the coccygeal area (4 times totally).

In Groups 1 and 2, the indices of mitotic activity of bone marrow and peripheral blood cells were studied.

Procurement of peripheral blood and the studied indices. Animals were sacrificed by cervical dislocation, and then decapitated. The harvested blood was heparinized in a 0.2 mg/ml heparin solution (Spofa, Czech Republic). The number of erythrocytes, leukocytes and the white blood cell diffe-



рименту зсувом шийних хребців, їх декапітували та отримували кров, яку потім гепаринізували в 0,2 мг/мл розчині гепарину (Spofa, Чехія). В гепаринізованих зразках крові визначали кількість еритроцитів, лейкоцитів і лейкоцитарну формулу за загальноприйнятими методами [8].

Отримання кісткового мозку й маніпуляції з ним. Вилучені стегна звільняли від м'язів, розрізали вздовж і вимивали кістковий мозок при температурі 37°C гіпотонічним 0,9%-м розчином цитратом натрію у стерильну пробірку. Отриману клітинну суспензію інкубували в гіпотонічному середовищі 10 хв за температури 37°C. Після цього її центрифугували протягом 5 хв при 200g і залишали небагато осаду у пробірці. Клітини фіксували у охолодженій суміші (метиловий спирт із крижаною оцтовою кислотою (3:1) за температури (6 ± 2)°C. Протягом 60-хвилинної фіксації за температури (6 ± 2)°C тричі змінювали фіксатор із проміжним ресуспендуванням осаду та наступним центрифугуванням. В останньому фіксаторі осад ресуспензували та наносили на стерильне прохолодне предметне скло (6 ± 2)°C. Скло швидко проводили через полум'я пальника да запалення фіксатора, але не допускали його перегрівання. Препарати забарвлювали за методом Романовського-Гімзи. Аналіз проводили по 2000 клітин, серед яких визначали такі, що перебувають у мітозі [8, 5], за допомогою мікроскопа «Carl Zeiss Primo Star» (Carl Zeiss, Німеччина).

Статистичну обробку отриманих даних здійснювали за допомогою параметричних методів (t-критерій Стьюдента), попередньо перевіряли вибірку на нормальність розподілу зі значеннями в таблицях, поданих у формі $X \pm SE$, де X — середнє значення показника з вибірки, SE — стандартна помилка середнього. Статистичний аналіз проводили з використанням програм «Excel» (Microsoft, США) та «PAST» (Palaeontological Association, Норвегія). Відмінності вважали надійними на рівні значущості $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Порівняльний аналіз показників мітотичного індексу кісткового мозку щурів в групах 1 та 2 було проведено в різних умовах (табл. 1). В умовах температури тіла під час негайного обстеження мітотичний індекс клітин кісткового мозку у інтактних тварин був у межах (14,73 ± 1,31)‰, що співпа-

Таблиця 1. Мітотична активність кісткового мозку самців щурів всіх підгруп, ‰

Table 1. Mitotic activity of the bone marrow of male rats of all subgroups, ‰

Група тварин (n=20) Group of animals (n=20)	Умови дослідження Experiment conditions	
	Негайне обстеження при температурі тіла тварин Immediate examination at body temperature of animals	Короткостроковий гіпотермічний вплив Short-term hypothermia
Інтактні Intact	14,73 ± 1,31	13,13 ± 1,10
Гірудологічний вплив Medicinal leech application	21,13 ± 2,04*	19,95 ± 2,22*

Примітка: * — показники, які значуще відрізняються від тварин інтактної групи ($p \leq 0,05$).

Note: * – indices, significantly different from those in intact group animals ($p \leq 0.05$).

rential were counted in heparinized blood samples according to the most common technique [1].

Bone marrow procurement and manipulation. The removed thighs were released from muscles, cut lengthwise, and the bone marrow was washed out at 37°C with hypotonic 0.9% sodium citrate solution into a sterile test tube. The obtained cell suspension was incubated in hypotonic medium for 10 min at 37°C. Then it was centrifuged for 5 min at 200 g and a small amount of pellet was left in the test tube. Cells were fixed in a cooled mixture (methyl alcohol with glacial acetic acid (3:1) at (6 ± 2)°C. During a 60-min fixation at (6 ± 2)°C, the fixative was thrice changed with an intermediate pellet resuspension and subsequent centrifugation. In the last fixative, the pellet was resuspended and applied to a sterile cool glass slide (6 ± 2)°C. The glass was rapidly passed through the burner flame so that the fixative ignited, but preventing it from overheating. Preparations were stained by Romanowsky-Giemsa. The analysis was carried out in 2,000 cells, and those in mitosis [1, 11] were determined with 'Carl Zeiss Primo Star' microscope (Carl Zeiss, Germany).

The data obtained were statistically processed using parametric methods (Student's t-test), the sample was preliminary tested for normality of distribution, with the values in Tables presented as $X \pm SE$, where X was the sample mean, SE was the standard error of the mean. Statistical analysis was performed using Excel (Microsoft, USA) and PAST (Palaeontological Association, Norway) software packages. Differences were considered reliable at a significance level of $p < 0.05$.

дає з даними інших авторів [3, 10, 11]. Результати аналізу мітотичного індексу кісткового мозку другого стегна за умов короткострокового гіпотермічного впливу протягом години були схожими з мітотичним індексом кісткового мозку першого

Results and discussion

The values of bone marrow mitotic index were comparatively analyzed in Groups 1 and 2 under different conditions (Table 1). Under body temperature conditions during immediate examination, a mitotic

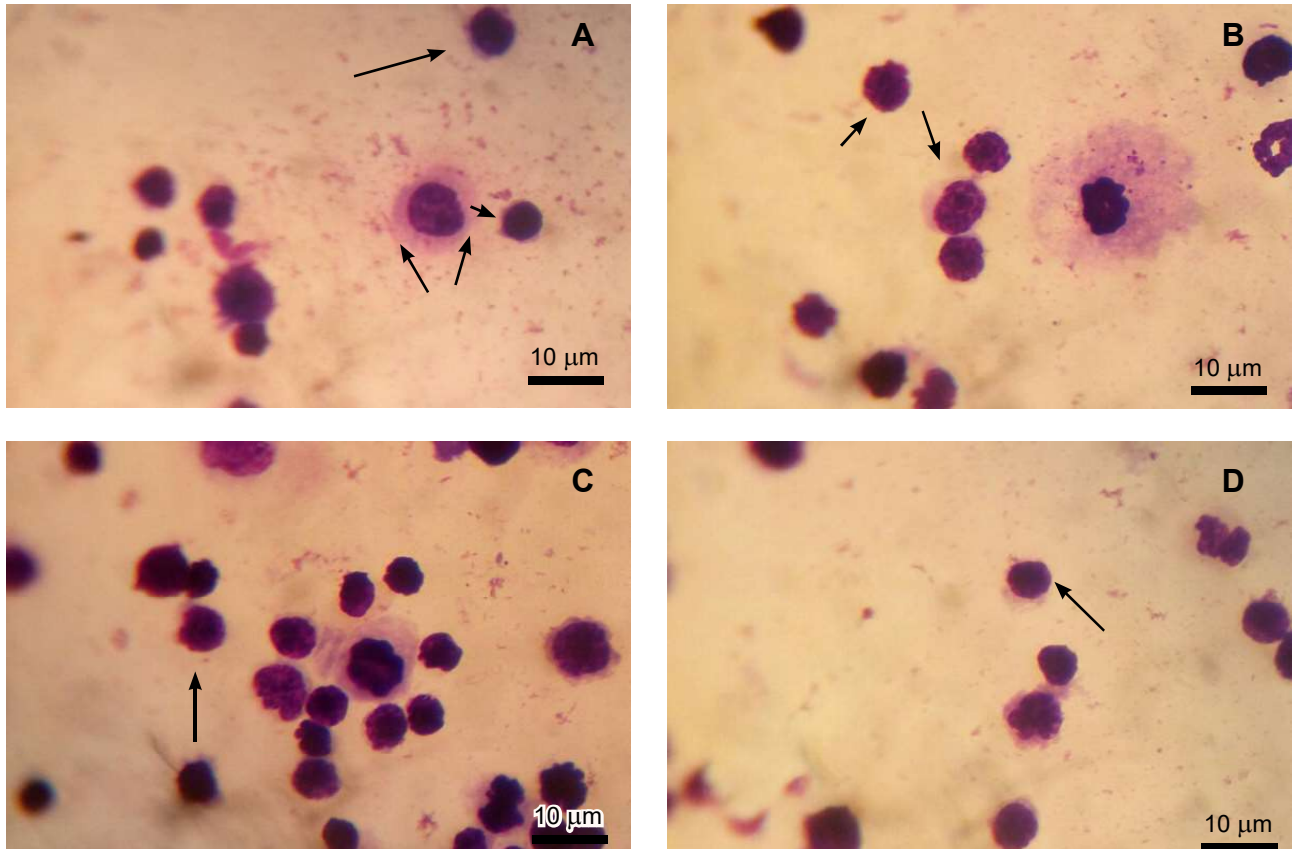


Рис. 1. Интерфазна стадія мітозу: **A** — негайне обстеження при температурі тіла інтактних тварин, **B** — негайне обстеження при температурі тіла тварин після гірудологічного впливу, **C** — короткостроковий гіпотермічний вплив на кістковий мозок інтактних тварин, **D** — короткостроковий гіпотермічний вплив на кістковий мозок інтактних тварин після гірудологічного впливу (чорними стрілками позначено клітину на стадії мітозу); забарвлення за методом Романовського-Гімзи.

Fig. 1. Interphase: **A** – immediate examination at body temperature of intact animals, **B** – immediate examination at body temperature of animals after medicinal leech application; **C** – short-term hypothermia on bone marrow of intact animals, **D** – short-term hypothermia on bone marrow of intact animals after medicinal leech application (black arrows mark a cell in mitotic stage); bar length is 10 µm; Romanowski–Giemsa stain.

стегна і дорівнювали $(13,13 \pm 1,10)\%$ ($p > 0,05$). Одержані дані свідчать, що відстрочення мітотичної активності в стегнах, що зберігалися за умов короткострокового гіпотермічного впливу протягом години за температури $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$, не впливає на вихідні його рівні, які отримано під час негайного обстеження стегна в умовах температури тіла тварини. Така стабільність показників мітотичного індексу кісткового мозку дає підставу вважати, що застосований короткостроковий гіпотермічний вплив дозволяє зберігати вихідні показники мітотичного індексу, а також фізіологічні властивості біологічних

index of bone marrow cells in the intact animals was within $(14.73 \pm 1.31)\%$, that coincided with the reported data of other authors [3, 4, 7]. The results of analysis of the bone marrow, derived from the second thigh under 1-hour short-term hypothermia were similar with the mitotic index of the bone marrow derived from the first thigh and made $(13.13 \pm 1.10)\%$ ($p > 0.05$). These data testified to the fact that a delayed analysis of mitotic activity in the thighs, stored under 1-hour short-term hypothermia at $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$ caused no effect on its initial levels obtained during immediate examination of the thigh at animal's



мембран клітин, які однаково реагували на гіпотонічний шок під час розведення для кон'югації хромосом і візуалізації фаз мітозу (рис. 1–5; табл. 1). Без впливу гіпотонічного шоку на

body temperature. This stability of bone marrow mitotic index values suggested the applied short-term hypothermia to enable preserving the initial values of mitotic index, as well as the physio-

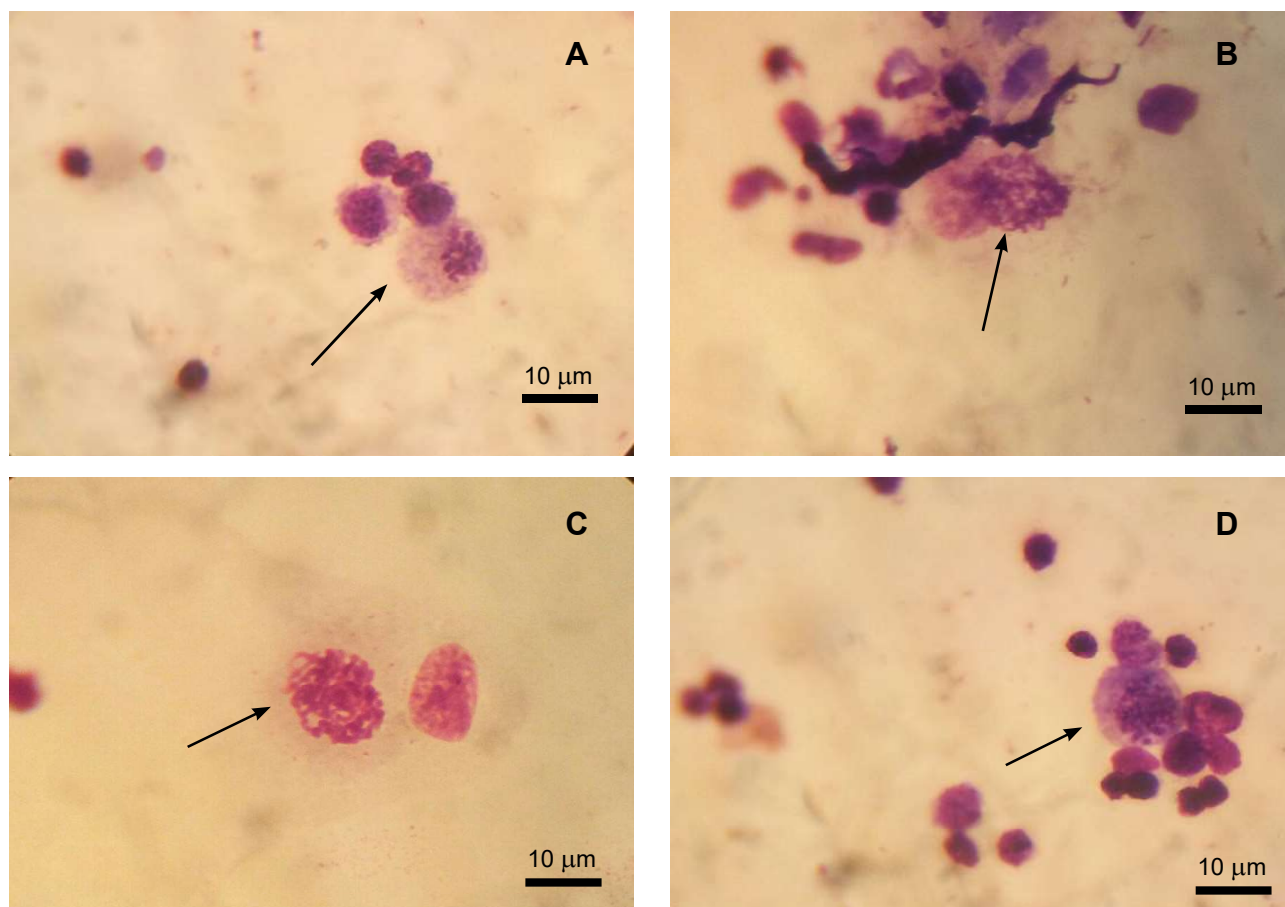


Рис. 2. Профазна стадія мітозу: **A** — негайне обстеження при температурі тіла інтактних тварин, **B** — негайне обстеження при температурі тіла тварин після гірудологічного впливу, **C** — короткостроковий гіпотермічний вплив на кістковий мозок інтактних тварин, **D** — короткостроковий гіпотермічний вплив на кістковий мозок інтактних тварин після гірудологічного впливу (чорними стрілками помічена клітина у стадії мітозу); забарвлення за методом Романовського-Гімзи.

Fig. 2. Prophase: **A** – immediate examination at body temperature of intact animals, **B** – immediate examination at body temperature of animals after medicinal leech application, **C** – short-term hypothermia on bone marrow of intact animals, **D** – short-term hypothermia on bone marrow of intact animals after medicinal leech application (black arrows mark a cell in mitotic stage); bar length is 10 µm; Romanowski–Giemsa stain.

активно проліферувальні клітини (наприклад, КМ) важко виокремити інтерфазний стан ядер клітин від тих, які знаходяться в інших фазах мітозу (наприклад, профазі та метафазі).

У якості зовнішнього впливу на КМ тваринам було поставлено медичну п'явку, що за нашими даними [4, 7, 9, 12] та даними інших авторів [6, 15–17, 20] викликало стимулювання показників переважно мієлоїдної та лімфоїдної систем організму. В даному експерименті виявлено стимулювальний вплив ГВ на мітотичну активність КМ щурів, який у подальшому реалізувався

gical properties of cell biological membranes, responded equally to hypotonic shock during dilution for chromosome conjugation and visualization of mitotic phases (Fig. 1–5; Table 1). With no impact of hypotonic shock on actively proliferating cells (e. g., BM), it is difficult to distinguish an interphase state of cell nuclei from those in other mitotic phases (e. g., prophase and metaphase).

As an external effect on BM, the medicinal leeches were applied to animals, that according to our data [2, 8–10] and the reports of other authors [14–17, 20], induced the stimulation of indices

підвищенням показників периферичної крові порівняно з інтактною групою. Кількість еритроцитів і лейкоцитів крові підвищилася на 20,9 та 26,3% відповідно, але без значущого зсуву

of mostly myeloid and lymphoid systems of the body. This study revealed a stimulating effect of MLA on mitotic activity of BM in rats, further realized by an increase in peripheral blood param-

Таблиця 2. Загальна кількість лейкоцитів та еритроцитів, лейкоцитарна формула крові
Table 2. Total leukocyte and erythrocyte counts, white blood cell differential

Група тварин (n = 20) Group of animals (n = 20)	Лейкоцити, × 10 ⁹ /л Leukocytes, × 10 ⁹ /L	Еритроцити × 10 ¹² /л Erythrocytes, × 10 ¹² /L	Лейкоцитарна формула крові, % White blood cell differential, %				
			Нейтрофіли Neutrophils		Лімфоцити Lymphocytes	Моноцити Monocytes	Еозинофіли Eosinophils
			сегментоядерні segmented	паличкоядерні banded			
Інтактна Intact	9,8 ± 0,33	5,3 ± 0,29	7,99 ± 0,24	3,11 ± 0,13	88,04 ± 1,4	0,66 ± 0,11	0,20 ± 0,01
Гірудологічний вплив Medicinal leech application	13,3 ± 0,44*	6,7 ± 0,34*	7,76 ± 0,23	2,91 ± 0,13	88,38 ± 1,3	0,72 ± 0,22	0,23 ± 0,03

Примітка: * — показники, які значуще відрізняються від тварин інтактної групи ($p \leq 0,05$).

Note: * – indices, significantly different from those of intact group animals ($p \leq 0.05$).

лейкоцитарної формули крові порівняно з інтактними тваринами, що свідчило про її збалансованість (табл. 2). За умов ГВ, як під час негайного обстеження, так і при короткостроковому гіпотермічному зберіганні стегна протягом години за температури $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$, не виявлено значущої різниці в показниках мітотичної активності КМ $(21,13 \pm 2,04)$ та $(19,95 \pm 2,22)\%$ відповідно (див. табл. 1).

Короткостроковий гіпотермічний вплив не відобразився негативно і на морфологічній структурі клітин кісткового мозку тварин груп 1 та 2. Мікроскопічний аналіз мазків кісткового мозку не виявив в них морфологічної різниці, що спостерігається на всіх стадіях мітозу: інтерфазі (див. рис. 1), профазі (див. рис. 2), метафазі (див. рис. 3), анафазі (див. рис. 4) та телофазі (рис. 5). Результати морфологічного аналізу клітин у всіх підгрупах показали їх нормальну фізіологічну форму та розмір, без пошкодження цитоплазми та ядра. Слід відмітити, що ГВ (як стимулювальний фактор) є фізіологічним і суттєво не впливає на гіпотермічну пролонгацію аналізу кісткового мозку та його подальшу реалізацію під час вивчення показ-

ters as compared to the intact group. Erythrocyte and leukocyte count increased by 20.9 and 26.3%, respectively, but with no significant shift in white blood cell differential vs. the intact animals, thus testified to its balance (Table 2). Under MLA, both during immediate examination and within 1-hour short-term hypothermic storage of thigh at $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$, no significant differences in the indices of BM mitotic activity were found, *i. e.* (21.13 ± 2.04) and $(19.95 \pm 2.22)\%$, respectively (see Table 1).

A short-term hyperthermia caused no negative effect on bone marrow cell morphology of animals from Groups 1 and 2. Microscopic examination of bone marrow smears revealed no morphological difference in them, which was observed throughout the all mitotic stages: interphase (see Fig. 1), prophase (see Fig. 2), metaphase (see Fig. 3), anaphase (see Fig. 4) and telophase (Fig. 5). The results of analysis of cell morphology in all the subgroups showed their normal physiological shape and size without any damage to cytoplasm and nucleus. Notably, that MLA (as a stimulating factor) is physiological and causes no significant effect on hypothermic prolongation of bone marrow analysis and its further implemen-



ників гемопоезу. Гіпотермія зразків кісткового мозку не вплинула на їх гіпотонічну обробку та морфологічний стан клітин на різних стадіях мітотичного циклу під час негайно-

tation when studying hematopoiesis parameters. Hypothermia of bone marrow samples did not affect their hypotonic treatment and cell morphology at different stages of mitotic cycle during

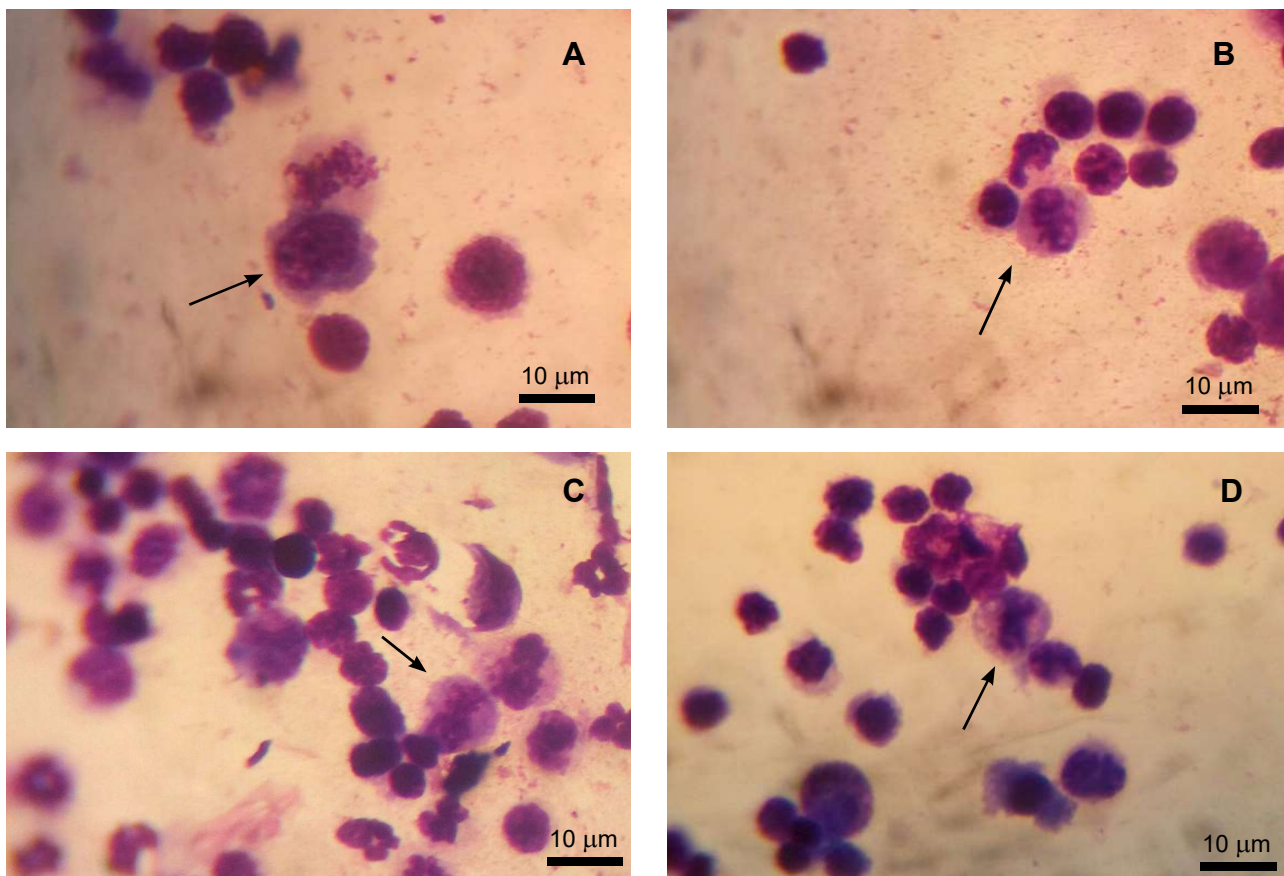


Рис. 3. Метафазна стадія мітозу: **A** — негайне обстеження при температурі тіла інтактних тварин, **B** — негайне обстеження при температурі тіла тварин після гірудологічного впливу, **C** — короткостроковий гіпотермічний вплив на кістковий мозок інтактних тварин, **D** — короткостроковий гіпотермічний вплив на кістковий мозок інтактних тварин після гірудологічного впливу (чорними стрілками помічена клітина на стадії мітозу); забарвлення за методом Романовського-Гімзи.

Fig. 3. Metaphase: **A** – immediate examination at body temperature of intact animals, **B** – immediate examination at body temperature of animals after medicinal leech application, **C** – short-term hypothermia on bone marrow of intact animals, **D** – short-term hypothermia on bone marrow of intact animals after medicinal leech application (black arrows mark a cell in mitotic stage); bar length is 10 µm; Romanowski–Giemsa stain.

го та короткострокового гіпотермічного впливу протягом години за температури (6 ± 2)°C (див. рис. 1–5).

У зв'язку з вищевказаним короткостроковий гіпотермічний вплив може бути включено в багатопрофільний алгоритм лабораторного аналізу під час вивчення мітотичного індексу в активно проліферувальних клітинах.

Висновки

1. Показано, що мітотичний індекс клітин кісткового мозку інтактних щурів статистично не відрізнявся під час негайного обстеження після вилучення з тіла ($14,73 \pm 1,31$)% та після

immediate and 1-hour short-term hypothermic exposures at (6 ± 2)°C (see Fig. 1–5).

Proceeding from the mentioned above, a short-term hypothermia may be included into a multidisciplinary algorithm of laboratory analysis when studying a mitotic index in actively proliferating cells.

Conclusions

1. Mitotic index of bone marrow cells in the intact rats was shown not to statistically differ when examined immediately after removal from the body (14.73 ± 1.31)% and followed a short-term hypothermia for an hour

короткострокового гіпотермічного впливу протягом години за температури $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$ ($(13,13 \pm 1,10)\%$), що свідчило про гіпотермальну фіксацію вихідного рівня мітотичного індексу та

at $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$ ($(13.13 \pm 1.10)\%$), thus testified to a hypothermal fixation of initial level of mitotic index and maintenance of biomembrane physiological state prior to hypotonic shock

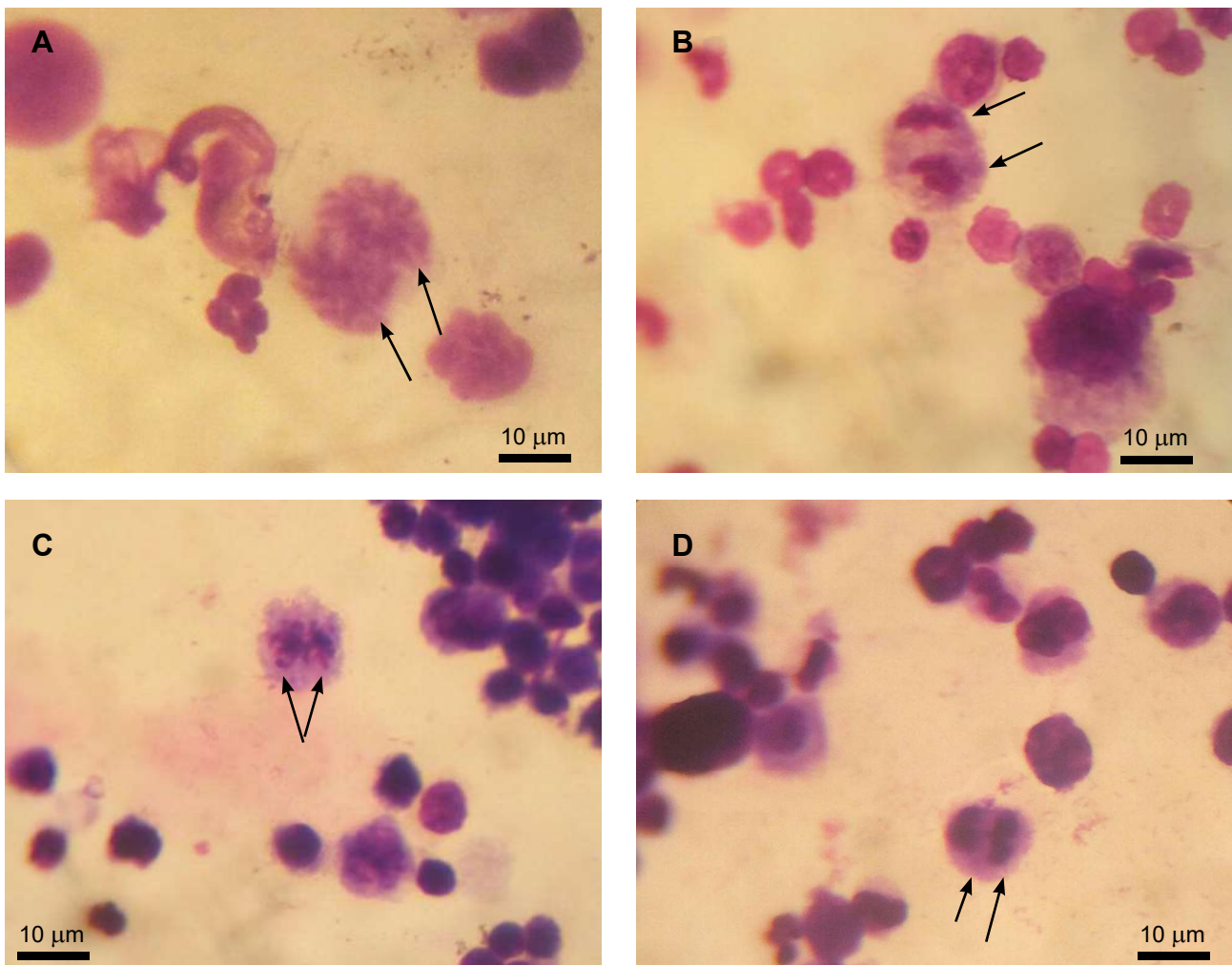


Рис. 4. Анафазна стадія мітозу: **A** — негайне обстеження при температурі тіла інтактних тварин, **B** — негайне обстеження при температурі тіла тварин після гірудологічного впливу, **C** — короткостроковий гіпотермічний вплив на кістковий мозок інтактних тварин, **D** — короткостроковий гіпотермічний вплив на кістковий мозок інтактних тварин після гірудологічного впливу (чорними стрілками помічена клітина у стадії мітозу); забарвлення за методом Романовського-Гімзи.

Fig. 4. Anaphase: **A** – immediate examination at body temperature of intact animals, **B** – immediate examination at body temperature of animals after medicinal leech application, **C** – short-term hypothermia on bone marrow of intact animals, **D** – short-term hypothermia on bone marrow of intact animals after medicinal leech application (black arrows mark a cell in mitotic stage); bar length is 10 µm; Romanowski–Giemsa stain.

стійкість фізіологічного стану біомембран після гіпотонічного шоку, з подальшим збереженням нормальних морфологічних структур клітин.

2. Встановлено, що після застосування тваринам гірудологічного впливу спостерігалася стимуляція проліферативної активності клітин кісткового мозку щурів, про що свідчить підвищення їх мітотичного індексу, який у подальшому був реалізований збільшенням кількості

with further normal cell morphology preservation.

2. Medicinal leech application revealed the stimulation of proliferative activity of rat bone marrow cells, as evidenced by an increase in their mitotic index, further implemented by an enhanced count of erythrocytes and leukocytes (by 20.9 and 26.3%, respectively), with a homeostatically balanced white blood cell diffe-



еритроцитів (на 20,9%) та лейкоцитів (на 26,3%), з гомеостатично збалансованою лейкоцитарною формулою крові. Оцінка мітотичної ак-

rential. Evaluation of bone marrow mitotic activity in rats after applying the medicinal leeches together with a 1-hour short-term hypothermia

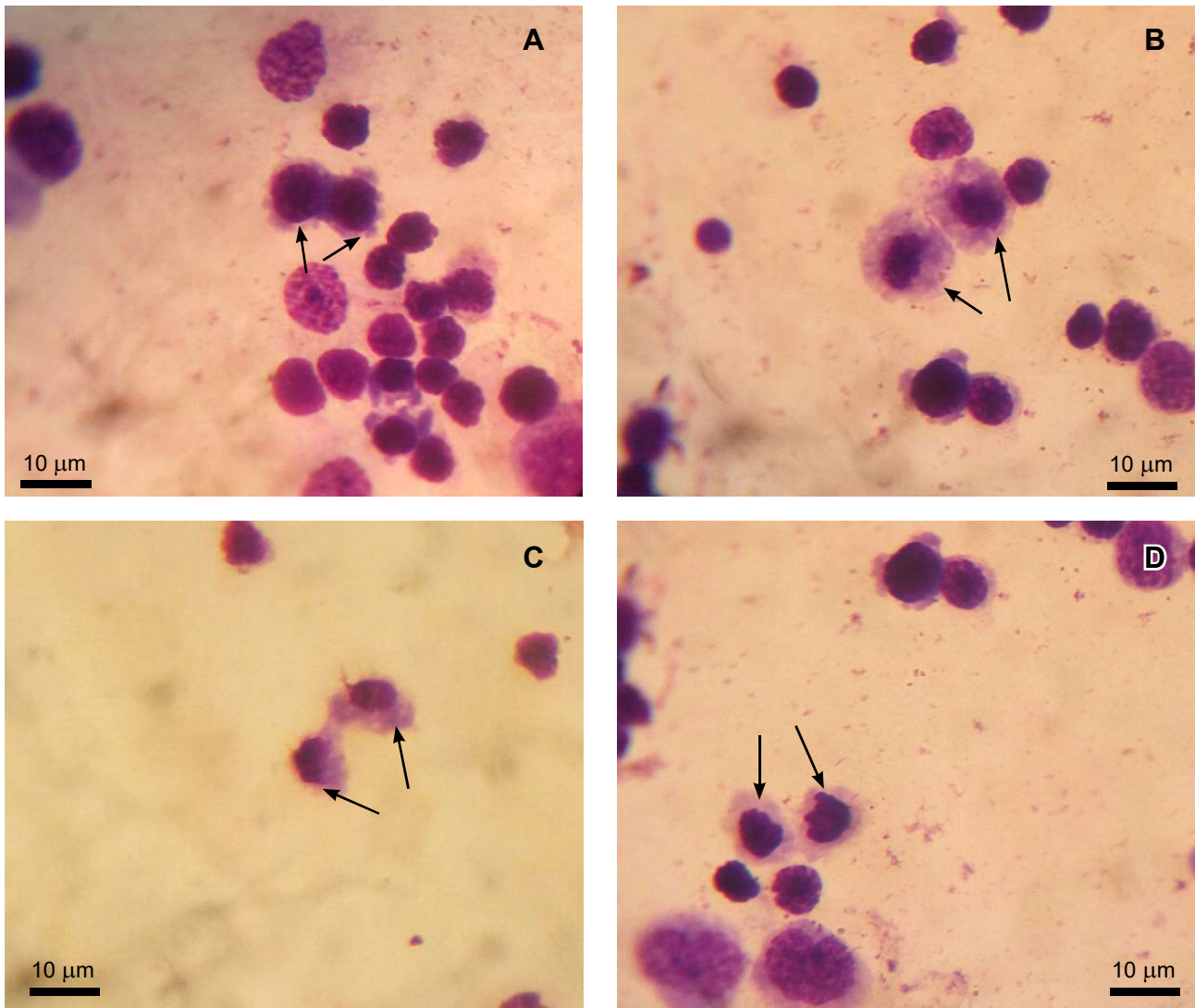


Рис. 5. Телофазна стадія мітозу: **A** — негайне обстеження при температурі тіла інтактних тварин, **B** — негайне обстеження при температурі тіла тварин після гірудологічного впливу, **C** — короткостроковий гіпотермічний вплив на кістковий мозок інтактних тварин, **D** — короткостроковий гіпотермічний вплив на кістковий мозок інтактних тварин після гірудологічного впливу (чорними стрілками помічена клітина у стадії мітозу); забарвлення за методом Романовського-Гімзи.

Fig. 5. Telophase: **A** — immediate examination at body temperature of intact animals, **B** — immediate examination at body temperature of animals after medicinal leech application, **C** — short-term hypothermia on bone marrow of intact animals, **D** — short-term hypothermia on bone marrow of intact animals after medicinal leech application (black arrows mark a cell in mitotic stage); bar length is 10 μm; Romanowski–Giemsa stain.

тивності кісткового мозку щурів після сумісного гірудологічного та короткострокового гіпотермічного впливу протягом години за температури $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$ не виявила змін цього показника $((21,13 \pm 2,04)$ та $(19,95 \pm 2,22)\%$ відповідно).

3. Використаний у роботі короткостроковий гіпотермічний вплив на клітини кістко-

at $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$ showed no changes in this index $((21.13 \pm 2.04)$ and $(19.95 \pm 2.22)\%$ respectively).

3. Applied here short-term hypothermia impact on bone marrow cells may be enrolled into multidisciplinary algorithm of laboratory analysis for study of mitotic index in actively proliferating cells.

вого мозку може бути включеним у багатофункціональний алгоритм лабораторного аналізу для вивчення мітогічного індексу активно проліферувальних клітин.

Література

1. Амінов РФ, Сирцов ВК, Федосєєва ОВ, Фролов ОК. Морфологічні показники селезінки та тимусу щурів після впливу сольового екстракту *Hirudo verbana*. Світ медицини та біології. 2019; (4): 183–7.
2. Амінов РФ, Фролов ОК. Проліферативна активність клітин кісткового мозку щурів за впливу біологічно активних речовин медичної п'явки. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2017; 8(4): 501–5.
3. Беркало ЛВ, Бобович ОВ, Боброва НО. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині. Полтава: Полімет; 2003. 320 с.
4. Іванов ОС, Багмут ІЮ, Цяпко ГВ, Скляр СІ. Вплив токсичних та субтоксичних доз диклофенаку натрію на механізми диференціювання клітин гранулоцитарного ряду, недиференційованих бластів та мітозу мієлоїдних клітин кісткового мозку щурів. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2019; 22(6): 46–51.
5. Ліндіна ЮМ, Сікора ВВ, Гирявенко НІ, та інш. Дослідження протективних властивостей вітаміну Е на кістковий мозок щурів в умовах підвищеного споживання солей важких металів. *Вісник Вінницького національного медичного університету*. 2019; 23(1): 59–64.
6. Сікора ВЗ, Приходько ОО. Структурно-функціональна характеристика крові щурів старечого віку в умовах дії солей важких металів. *Український морфологічний альманах*. 2010; 8(2): 191–3.
7. Френкель МА, Чигринова ЕВ, Купрышина НА, Павловская АІ. Диагностическое значение исследования отпечатков трепанобиоптатов костного мозга больных неходжкинскими лимфомами. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2007; (11):44-7.
8. Aminov R, Aminova A, Makyeyeva L. Morphological parameters of spleen and thymus of the male rats on the basis of the hirudological influence of *Hirudo verbana*. *Ann Parasitol*. 2022; 68(1): 55–60.
9. Aminov R, Frolov A, Aminova A. The effect of the biologically complex of a medical leech active substances on the immunosuppressive state of rats. *Jordan J Biol Sci*. 2022; 15(2): 257–61.
10. Aminov RF, Frolov AK. Influence of ectoparasite – *Hirudo verbana* on morphogenetic reactions of the host organism – rattus. *Curr Trends Immunol*. 2017; 18: 107–17.
11. Aminov RF, Frolov AK. The impact of fetal load of *Hirudo verbana* saline extract antigens morphometrical, hematological and immunological parameters of rats in the early stages of post-embryonic development. *Ann Parasitol*. 2018; 64(1): 13–20.
12. He N, Zhang L, Cui J, Li Z. Bone marrow vascular niche: home for hematopoietic stem cells. *Bone Marrow Res*. [Internet]. 2014 Apr 14 [cited 14.02.2021]; 2014: 128436. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmr/2014/128436/>
13. Ohiienko SL, Bondar AYU, Ivanov EG, Bozhkov AI. Liver fibrosis has a different effect on the "lifespan" of lymphocytes and neutrophils in the in vitro system isolated from the bone marrow of young and old rats. *MOJ Gerontol Ger*. 2019; 4(1): 36–40.
14. Ojo PO, Babayi H, Olayemi IK, et al. Anti-tubercular activities and molecular characterization of salivary extract of leech (*Hirudo medicinalis*) against mycobacterium tuberculosis. *J Tuber Res*. 2018; 6(1): 1–9.

References

1. Aminov R, Aminova A, Makyeyeva L. Morphological parameters of spleen and thymus of the male rats on the basis of the hirudological influence of *Hirudo verbana*. *Ann Parasitol*. 2022; 68(1): 55–60.
2. Aminov R, Frolov A, Aminova A. The effect of the biologically complex of a medical leech active substances on the immunosuppressive state of rats. *Jordan J Biol Sci*. 2022; 15(2): 257–61.
3. Aminov RF, Frolov AK. Influence of ectoparasite – *Hirudo verbana* on morphogenetic reactions of the host organism – rattus. *Curr Trends Immunol*. 2017; 18: 107–17.
4. Aminov RF, Frolov AK. The impact of fetal load of *Hirudo verbana* saline extract antigens on morphometrical, hematological and immunological parameters of rats in the early stages of post-embryonic development. *Ann Parasitol*. 2018; 64(1): 13–20.
5. Aminov RF, Frolov OK. [Proliferative activity of bone marrow cells of rats under the influence of biologically active substances of a medicinal leech]. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2017; 8(4): 501–5. Ukrainian.
6. Aminov RF, Syrtsov VK, Fedosieieva OV, Frolov AK. [Morphological parameters of spleen and thymus of the rats after the influence of *Hirudo verbana* saline extracts]. *World of Medicine and Biology* 2019; (4): 183–7. Ukrainian
7. Berkalo LV, Bobovich OV, Bobrova NO. [Methods of clinical and experimental research in medicine]. *Poltava: Polimet*; 2003. 320 p. Ukrainian.
8. Frenkel MA, Chigrinova EV, Kupryshina NA, Pavlovskaja AI. [Diagnostic value of study of bone marrow trepanobiopsy imprints in patients with non-Hodgkin's lymphomas]. *Klin Lab Diagn*. 2007; (11):44–7. Russian.
9. He N, Zhang L, Cui J, Li Z. Bone marrow vascular niche: home for hematopoietic stem cells. *Bone Marrow Res*. [Internet]. 2014 Apr 14 [cited 14.02.2021]; 2014: 128436. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmr/2014/128436/>
10. Ivanov OS, Bagmut IYu, Tsapko GV, Sklyar SI. [Influence of toxic and subtoxic doses of diclofenac sodium on mechanisms of differentiation of granulocytary row cells, undifferentiated blasts and mitotic cells in the bone marrow of rats]. *Ukrainskyi Zhurnal Medytsyny, Biologii ta Sportu*. 2019; 22(6): 46–51. Ukrainian.
11. Lyndina YuM, Sikora VV, Hyriavenko NI, et al. [The study of the protective properties of vitamin E on bone marrow of rats in condition of the increased intake of heavy metals salts]. *Reports of Vinnytsia National Medical University*. 2019; 23(1): 59–64. Ukrainian.
12. Ohiienko SL, Bondar AYU, Ivanov EG, Bozhkov AI. Liver fibrosis has a different effect on the "lifespan" of lymphocytes and neutrophils in the in vitro system isolated from the bone marrow of young and old rats. *MOJ Gerontol Ger*. 2019; 4(1): 36–40.
13. Ojo PO, Babayi H, Olayemi IK, et al. Anti-tubercular activities and molecular characterization of salivary extract of leech (*Hirudo medicinalis*) against mycobacterium tuberculosis. *J Tuber Res*. 2018; 6(1): 1–9.
14. Praise OO, Babayi H, Olayemi IK, et al. Effects of leech salivary extract (lse) on indices of liver function in rats. *Clin Diagn Pathol*. 2018 Jan 31 [cited Mar 10 2021]; 2(1): 1000124. Available from: <https://www.oatext.com/Effects-of-leech-salivary-extract-lse-on-indices-of-liver-function-in-rats.php#Article>.
15. Shakouri A, Adljouy N, Abdolalazadeh J. Anti-cancer activity of liposomal medical leech saliva extract (LSE). In: *Proceedings of the 3rd World Congress on Recent Advances in Nanotechnology (RAN'18)*. Budapest, Hungary, April 10–12, 2018. Budapest; 2018. Paper No. NDDTE 102. [Internet] [cited 12.02.2021]. Available from: https://avestia.com/RAN2018_Proceedings/files/paper/NDDTE/NDDTE_102.pdf.
16. Sikora VZ, Prihodko OO. [Structural and functional characteristics of blood of senile rats under the action of heavy metal salts]. *Ukrainskyi Morfolohichniy Almanakh*. 2010; 8(2): 191–3. Ukrainian.



15. Praise OO, Babayi H, Olayemi IK, et al. Effects of leech salivary extract (lse) on indices of liver function in rats. *Clin Diagn Pathol*. [Internet] 2018 Jan 31 [cited Mar 10 2021]; 2(1): 1000124. Available from: <https://www.oatext.com/Effects-of-leech-salivary-extract-lse-on-indices-of-liver-function-in-rats.php#Article>
16. Shakouri A, Adljouy N, Abdolalizadeh J. Anti-cancer activity of liposomal medical leech saliva extract (LSE). In: Proceedings of the 3rd World Congress on Recent Advances in Nanotechnology (RAN'18). Budapest, Hungary, April 10-12, 2018. Budapest; 2018. Paper No. NDDTE 102. [Internet] [cited 12.02.2021]. Available from: https://avestia.com/RAN2018_Proceedings/files/paper/NDDTE/NDDTE_102.pdf.
17. Sobczak N, Kantyka M. Hirudotherapy in veterinary medicine. *Ann Parasitol*. 2014; 60(2): 89–92.
18. Tavian M, Péault B. Embryonic development of the human hematopoietic system. *Int J Dev Biol*. 2005; 49(2-3): 243–50.
19. Travlos GS. Histopathology of bone marrow. *Toxicol Pathol*. 2006; 34(5): 566–98.
20. Yu G, Baeder DY, Regoes RR, Rolff J. Combination effects of antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60(3): 1717–24.
17. Sobczak N, Kantyka M. Hirudotherapy in veterinary medicine. *Ann Parasitol*. 2014; 60(2): 89–92.