

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Р. Ф. АМІНОВ

**ПРИРОДНИЙ ІМУНОМОДУЛЯТОР  
ІЗ ТІЛ МЕДИЧНИХ П'ЯВОК:  
ОТРИМАННЯ ТА ЗАСТОСУВАННЯ**

МОНОГРАФІЯ

Запоріжжя  
2022

УДК 615.375 : 595.143

А 62

Рецензенти:

доктор біологічних наук, професор, завідувач кафедри хімії  
Запорізького національного університету

*Бражко О. А.,*

кандидат біологічних наук, доцент кафедри медичної біології,  
паразитології та генетики Запорізького державного медичного університету

*Алієва О. Г.,*

кандидат медичних наук, доцент, в.о. завідуючого кафедри гістології,  
цитології та ембріології Запорізького державного медичного університету

*Федосєєва О. В.*

*Рекомендовано до друку Вченою радою  
Запорізького національного університету  
(протокол № 12 від 12.05.2022)*

*Матеріали подано в авторській редакції*

**А 62 Амінов Р. Ф.** Природний імуномодулятор із тіл медичних п'явок: отримання та застосування: монографія. – Запоріжжя : Запорізький національний університет, 2022. – 164 с.

ISBN 978-966-599-605-7

Монографія присвячена розробці природного імуномодулятора з тіл медичних п'явок. У першому розділі описуються усі відомі біологічно активні речовини, які були отримані з організму медичних п'явок. Наводиться детальний опис їх дії та ефектів, використання їх у ветеринарії, сільському господарстві та медицині. Описуються різні методи їх отримання в комплексі, протипоказання та побічні ефекти, які можуть виникнути при їх застосуванні. Наступні розділи експериментально на тваринах у різні періоди онтогенезу, відображають імуномодуляторну дію слини та екстракту отриманих із медичних п'явок.

Монографія може зацікавити фахівців біологічного, фармацевтичного та медичного профілів, студентів, аспірантів, співробітників науково-дослідних інститутів.

**УДК 615.375: 595.143**

ISBN 978-966-599-605-7

© Запорізький національний університет, 2022

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ</b> .....	8
<b>ВСТУП</b> .....	9
<b>РОЗДІЛ 1. БІОЛОГІЧНІ ТА ТЕРАПЕВТИЧНІ ЕФЕКТИ РЕЧОВИН ОТРИМАНИХ ІЗ МЕДИЧНИХ П'ЯВОК</b> .....	11
Огляд відомих біологічно активних речовин отриманих із організму медичних п'явок.....	11
Літичні сполуки.....	11
Антигемостатики.....	12
Блокатори запальних реакцій організму .....	14
Допоміжні речовини .....	15
Основні ефекти від гірудологічного впливу.....	17
Антикоагулянтний ефект.....	17
Протимікробна, знеболююча та протизапальна дія.....	17
Загоювання ран та судинорозширювальний ефект.....	19
Пригнічення функції тромбоцитів.....	19
Ефективність використання біологічно активних речовин медичних п'явок у ветеринарії та сільському господарстві.....	20
Використання біологічно активних речовин медичної п'явки у медицині при профілактиці та лікуванні різних захворювань.....	21
Можливість використання гірудотерапії при профілактиці, допоміжному лікуванні та швидкому реабілітаційному відновленні при Covid-19.....	25
Відновлення серцево-судинної системи при Covid-19.....	26
Здатність БАР медичної п'явки відновлювати органи дихання після Covid-19.....	30
Відновлення імунної системи гірудотерапією при Covid-19.....	32
Застосування гірудотерапії при інших патологіях та захворюваннях.....	34
Протипоказання та виникнення побічних ефектів після гірудотерапії.....	34

Протипоказання до гірудотерапії.....	34
Побічні ефекти від гірудотерапії.....	35
Методи отримання комплексу біологічно активних речовин з медичних п'явок.....	36
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....</b>	<b>38</b>
Матеріал, що використовувався у роботі.....	38
Методи дослідження.....	39
Приготування водно-сольового екстракту з тіл медичної п'явки.....	39
Отримання оптимальної терапевтичної концентрації біологічно активних речовин <i>in vitro</i> .....	40
Визначення токсичності, тератогенної та ембріотоксичної дій речовини <i>in vivo</i> .....	41
Морфометричні методи аналізу тіла та основних лімфоїдних органів....	41
Підготовка зразків біологічного матеріалу.....	42
Гематологічні, біохімічні, імунологічні, цитологічні та гістологічні методи аналізу .....	42
Оцінка лейкоцитарного складу крові.....	42
Оцінка показників гемограми.....	43
Дослідження оксидативного метаболізму нейтрофілів.....	44
Оцінка проліферативної активності лімфоцитів.....	45
Визначення фагоцитарної активності нейтрофілів .....	46
Оцінка проліферативної активності кісткового мозку.....	47
Гістологічні методи аналізу.....	47
Аналіз репродуктивної функції.....	48
Статистична обробка даних.....	48
<b>РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ ВОДНО-СОЛЬОВОГО ЕКСТРАКТУ ІЗ МЕДИЧНИХ П'ЯВОК НА МОРФОМЕТРИЧНІ, МОРФОЛОГІЧНІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ ЩУРІВ .....</b>	<b>49</b>
Отримання <i>in vitro</i> оптимальної терапевтичної концентрації водно-сольового екстракту.....	49

Визначення гострої токсичності, тератогенної та ембріотоксичної дії водно-сольового екстракту .....	50
Схеми подальших експериментальних досліджень.....	51
Гематологічні, морфометричні показники тіла та лімфоїдних органів самиць та їхнього приплоду .....	53
Поглиналина активність та оксидативний метаболізм нейтрофілів крові самиць та їхнього приплоду .....	60
Проліферативна активність лімфоцитів крові самиць та їхнього приплоду .....	63
Мітотичний індекс кісткового мозку самиць щурів та їхнього приплоду .....	65
Цитоморфологічні показники селезінки та тимусу самиць щурів та їхнього приплоду.....	66
Кореляційний взаємозв'язок між показниками.....	71
<b>РОЗДІЛ 4. МОРФОМЕТРИЧНІ, МОРФОЛОГІЧНІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ ЩУРІВ НА ФОНІ ГІРУДОЛОГІЧНОГО ВПЛИВУ .....</b>	
<b>73</b>	
Схема експериментальних досліджень.....	73
Гематологічні, морфометричні показники тіла та лімфоїдних органів самиць щурів та їхнього приплоду .....	75
Поглиналина активність та оксидативний метаболізм нейтрофілів крові самиць та їхнього приплоду.....	79
Проліферативна активність лімфоцитів крові самиць та їхнього приплоду .....	81
Мітотичний індекс кісткового мозку самиць щурів та їхнього приплоду .....	86
Цитоморфологічні показники селезінки та тимусу самиць щурів та їхнього приплоду .....	87
Кореляційний взаємозв'язок між показниками.....	92
Узагальнення 3 та 4 розділів .....	93
<b>РОЗДІЛ 5. ІМУННА СИСТЕМА ТА РЕПРОДУКТИВНА ФУНКЦІЯ САМЦІВ ЩУРІВ НА ФОНІ ГІРУДОЛОГІЧНОГО ВПЛИВУ..</b>	
<b>100</b>	
Схема експериментальних досліджень.....	100
Вага тіла та лімфоїдних органів .....	101

Вага надсімяників, загальна кількість сперматозоїдів їх морфологія та фертильність у еякуляті .....	102
Цитоморфологічні показники селезінки та тимусу статевозрілих самців щурів.....	104
Узагальнення 5 розділу.....	106
<b>РОЗДІЛ 6. НЕПРЯМИЙ ВПЛИВ КОМПЛЕКСУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН <i>HIRUDO VERBANA</i> НА ІМУННУ СИСТЕМУ ЩУРІВ.....</b>	<b>109</b>
Схема експериментальних досліджень.....	109
Чисельність, загальна вага та смертність приплоду.....	111
Гематологічні, імунологічні та гістологічні показники самиць та їх приплоду.....	112
Узагальнення 6 розділу.....	115
<b>РОЗДІЛ 7. КОРЕКЦІЯ ІМУНОСУПРЕСИВНОГО СТАНУ САМЦІВ ЩУРІВ НА ФОНІ ВВЕДЕННЯ ВОДНО-СОЛЬОВОГО ЕКСТРАКТУ МЕДИЧНИХ П'ЯВОК.....</b>	<b>117</b>
Отримання корегуючої хімічної імуносупресивної моделі.....	117
Схема експериментального дослідження.....	117
Дослід.....	118
Узагальнення першої частини 7 розділу.....	124
Корекція імуносупресивного стану за допомогою біологічно активних речовин медичних п'явок.....	125
Схема експериментальних досліджень.....	125
Дослід.....	126
Узагальнення другої частини 7 розділу.....	130
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>131</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....</b>	<b>132</b>



**Амінов Руслан**, кандидат біологічних наук (імунологія), старший викладач кафедри фізіології, імунології і біохімії з курсом цивільного захисту та медицини, завідуючий лабораторією клітинної та організменної біотехнології Запорізького національного університету

Автор монографії щиро висловлює свою вдячність колезі, науковому керівнику, доктору медичних наук, професору **Фролову О. К.**

## ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

ГТ	гірудотерапія
МП	медична п'явка
БАР	біологічно активні речовини
СП	слина п'явки
АДФ	аденозиндифосфат
ФАН	фагоцитарна активність нейтрофілів
ІЛ	інтерлейкіни
ССЗ	секрет слинних залоз
РБТЛ	реакція бластної трансформації лімфоцитів
КонА	конканавалін А
ФІ	фагоцитарний індекс
ФЧ	фагоцитарне число
НСТ	нітросиній тетразолій
ГВ	гірудовплив
ОМН	оксидативний метаболізм нейтрофілів
ЛФ	лімфоїдний фолікул
КМ	кістковий мозок
ОГ	окружність грудної клітки
ОЖ	окружність живота
МІ	мітотичний індекс
ЦА	центральні артерії
CD	cluster of differentiation – кластер диференціації
C1	інгібітор комплементу
HLF	гірудіноподібні фактори



## ВСТУП

В XXI ст. різко зріс відсоток захворювань та патологічних станів інфекційної та не інфекційної природи. В більшості випадків всі патологічні стани в організмі виникають із-за порушення гомеостатичного стану імунної системи, яка не здатна на повну давати відсіч цим недугам.

У результаті чого підвищується інтерес до пошуку різних методів та створення нових високоефективних і малотоксичних біологічно активних речовин (БАР) із імуномодуляторною дією. Серед яких важливе місце займають природні БАР, які в більшості отримують із організму бактерій, рослин та тварин. Вони володіють великим комплексом терапевтичної дії, практично у відсутності протипоказань та побічних ефектів [1-7]. За останнє двадцятиріччя велику увагу почали приділяти натуротерапевтичним методам, до який відноситься і гірудотерапія (ГТ) [1-7]. ГТ – це лікувальний метод у якому використовують медичних п'явок (МП). Вони володіють широким спектром терапевтичної дії: регулюють гемостаз та судинний тонус, мають протизапальні, регенераційні, нейротропні, бактеріостатичні, імуномодуляторні ефекти [1-7]; за рахунок наявності в їх організмі більше 100 БАР, які не мають аналогів у світі та можуть бути ефективними у використанні в ветеринарії та медицині — це гірудин, егліні, бделіни, ферменти: гіалуронідаза, дестабілаза, колагеназа, апіраза, еластаза та ін. [1, 2, 4; 8-11]. БАР МП мають імуномодуляторний ефект, який відображається у зрушеннях клітин вродженого та адаптивного імунітету, проявляють антимікробну [1, 12, 13-21] та протизапальну дію [13], позитивно впливають на формотворчі регенераційні процеси [7, 18, 23, 22], стимулюють ріст нервових волокон спінального ганглію ембріона курки [7]. ГТ та фармакологічні препарати на основі БАР МП ефективно використовують із метою профілактики та лікування багатьох захворювань: для лікування хронічних дерматозів [24-26], лейоміоми шкіри [27], псоріазу [28, 29], серцевої недостатності [30], гіпертонічної хвороби [31], інфекційного міокардиту [32], стенокардії [33], лікування глаукоми,

проліферативної ретинопатії [2, 34-38], геморагічно-фібриноїдного синдрому [39], при гострій сенсоневральній приглухуватості [40, 41], гострих та хронічних захворюваннях середнього та внутрішнього вуха [8, 42-44], при радикулопатіях [45], артритих [46-48], остеохондрозах [8, 49, 50], артрозах [51], при цереброваскулярних захворюваннях [52-57], ендометріозі, міомі матки, хронічних запаленнях придатків [58-60], при нефритах [61], діабетичній стопі [2, 62], діабеті [63], діабетичній нефропатії, лікуванні тромбофлебітів [2, 64-66], варикозу та інших судинних розладах [67-72], при хронічних та дистрофічних захворюваннях слинних залоз [73], стоматитах, пульпітах та ін. [15,73-83]. Також, ефективне застосування ГТ знайшла в психотерапії [84-86], для усунення проявів алергії [87]. В практиці зарубіжних країн МП використовують при трансплантаціях із метою усунення венозного застою, лікуванні захворювань нервової системи [8, 88-99], в реконструктивній хірургії [8, 100-106], терапії раку [2, 100, 105, 106], при інфекційних захворюваннях, для загоєння ран [107-110], чоловічому та жіночому безплідді [111, 112], чоловічому пріапізмі [113]. ГТ також почали використовувати із метою профілактики онкологічних захворювань [8, 45, 114].

Представлена значна кількість досліджень, щодо використання ГТ у ветеринарії та медицині, доводить значний вклад її у профілактиці та лікування різних захворюваннях, але на цей час все залишається мало вивчений імуномодуляторний ефект їх БАР.

Дана робота ілюструє підходи та результати експериментів, які сконцентровані на отриманні природного імуномодулятора з БАР МП, одночасно із вивченням інших біологічних та терапевтичних ефектів, які вони проявляють. Природні БАР МП, які представлені у монографії мають потенціал стати ефективними при профілактиці та лікуванні багатьох захворювань у ветеринарії та вподальшому з впровадженням їх у медицину, за рахунок прояву широкого спектру терапевтичних ефектів, з практично відсутніми побічними ефектами та токсичними властивостями.

## РОЗДІЛ 1. БІОЛОГІЧНІ ТА ТЕРАПЕВТИЧНІ ЕФЕКТИ РЕЧОВИН ОТРИМАНИХ ІЗ МЕДИЧНИХ П'ЯВОК

### Огляд відомих біологічно активних речовин отриманих із організму медичних п'явок

МП містять понад 100 БАР, які володіють різними терапевтичними ефектами: судинорозширювальним, тромболітичним, протизапальним, знеболюючим, можуть пригнічувати адгезію та агрегацію клітин, відновлювати пошкоджену судинну проникність тканин і органів, усувати гіпоксію, позбавляти від інфаркту та інсультів, детоксифікувати організм антиоксидантними шляхами, мають протинабряковий та антимікробний ефекти [2, 115-117]. Із відомих БАР: гірудин, гіалуронідаза, калін, дестабілаза, апіраза, егліни (інгібітори еластази, катепсину G), бделіни, декорзин (антагоніст глікопротеїну, інгібітор агрегації тромбоцитів), гірустатин, пігуамерин (інгібітор плазмового калікліреїну), тромбоцитарний антагоніст активації (антитромбічний ефект) інгібітора триптази, хлороміцентин (антибіотик), інгібітори карбоксипептидази А та ацетилхолін [2, 115, 116]. О. Ю. Каменев (2007) розділяє увесь комплекс БАР МП на 4 групи: літичні сполуки, які руйнують тканини і мікросудини жертви, антигемостатики, які блокують механізми гемостазу, блокатори захисних реакцій організму, які протидіють запальним реакціям, що розвиваються в тканинах у відповідь на пошкодження та допоміжні речовини [1, 8, 118].

#### *Літичні сполуки*

БАР, які забезпечують проникнення інших БАР МП, руйнують тканини жертви, розширюють рани, розплавляють мікросудини, впливають на проникність міжклітинного матриксу дерми. Дана група включає: пептидазу (дестабілазу), гіалуронідазу, колагеназу [1, 2, 8].

1. Пептидаза (дестабілаза) — це фермент, що руйнує певний тип зв'язків у молекулі білка —  $\epsilon$ -( $\gamma$ -глутаміл)-лізинові-ізопептидні зв'язки, які утворюють поперечні зшивання [118-120], вони широко представлені в плазмових, мембранних і структурних білках. Даний тип зв'язків утворюється при стабілізації фібрину, а їх руйнування забезпечує фібринолітичну активність секрету [1, 8, 121]. Пептидаза здатна впливати на функціональну активність різних клітин: ендотеліоцитів, лімфоцитів, тромбоцитів, макрофагів та ін. [1, 8]. Поліфункціональний білок дестабілаза-лізоцим володіє не лише активністю дестабілази, а й лізоцимною та антимікробною активністю, він є антибіотиком, який пригнічує розвиток багатьох бактерій, грибів та архей. Спектр його антимікробної дії зростає при втраті мурамідазної активності [122].

2. Гіалуронідаза — це фермент, що каталізує реакції гідролітичного розщеплення і деполімеризації гіалуронової кислоти і споріднених із нею сполук (кислих муко полісахаридів) [1, 2, 16, 121]. Враховуючи, що глікозоаміноглікани гіалуронової кислоти входять до складу базальної мембрани, міжклітинного матриксу, а також базальних мембран капілярів, вона відіграє велику роль не лише як фактор проникнення, а й у виникненні наступних фізіологічних реакцій [1, 8, 121]. У складі слини МП виявлені 2 гіалуронідази, які відрізняються за здатністю впливати на хондроїтинсульфат [1, 8].

3 олагеназа викликає гідроліз волокон колагену I типу і подібна до колагенази людини. Можливо, бере участь у інгібіції колаген-індукованої агрегації тромбоцитів [1, 2, 8]. Гіалуронідаза та колагеназа — це ферменти, які збільшують проникнення до організму різних речовин, також виконують бактерицидну та бактеріостатичну дії [8, 123].

### *Антигемостатики*

Група БАР, які перешкоджають механізмам розвитку згортання крові, забезпечують вільний відтік крові з пошкоджених судин протягом всього періоду харчування МП. Потрапляючи з кров'ю в кишечник МП підтримують

її в рідкому стані. У складі БАР МП виявлені речовини, що блокують всі основні механізми активації системи згортання крові [2, 8]. До них відносять: калін, апіраза, антагоніст PAF, інгібітор Ха фактора, гірудин.

1. Калін — це інгібітор адгезії та агрегації тромбоцитів, активації фактора Вілебранда [1, 8, 121].

2. Апіраза — це інгібітор агрегації тромбоцитів ініційований аденозиндифосфат (АДФ) [1, 8], викликає гідроліз аденозинових нуклеотидів (АТФ і АДФ), причому майже з однаковою початковою швидкістю [1, 8]. Апіраза визначає протисклеротичний вплив МП, підвищує активність ліпопротеїдліпази, і як наслідок знижує рівень загального холестерину і  $\beta$ -ліпопротеїдів низької щільності [2, 8].

3. Антагоніст PAF (фактору активації тромбоцитів) — перешкоджає адгезії та активації тромбоцитів, міграції тромбоцитів і нейтрофілів до вогнища ураження [1, 8, 124], а також скороченню гладенько-м'язових клітин. PAF — це фосфогліцерид, що виділяється в процесі імунологічних реакцій нейтрофілами, базофілами та макрофагами, а також у процесі специфічної активації тромбоцитів. PAF є потужним медіатором запалення і, виділяючись у ділянці ранки, ініціює гемостаз та запальну реакцію [1, 8].

4. Інгібітор Ха фактора (FXaI — factor Xa inhibitor) — це фермент, що каталізує перетворення протромбіну в тромбін у присутності іонів  $Ca^{2+}$ , фактора згортання крові V на поверхні мембран активованих тромбоцитів чи фрагментів зруйнованих ендотеліальних гладенько-м'язових клітин (інколи фактор Ха називають протромбіназою). Синтезований рекомбінантний FXaI здійснює захисний вплив проти венозного тромбоутворення [1, 8]. Відіграє важливу роль при лікуванні остеоартриту і ревматоїдного артрити [100].

5. Гірудин — це унікальний високоспецифічний інгібітор ферменту тромбіну, він блокує всі відомі реакції, активатором яких виступає тромбін [1, 16, 42, 121]: активацію фібриногену і перетворення його в нерозчинний фібриновий згусток; регуляцію V, VIII, XIII факторів згортання; регуляцію компонентів системи комплементу; зміни функціонального стану моноцитів та

нейтрофілів, у тому числі і агрегацію тромбоцитів; зміни стану ендотеліальних та гладенько-м'язових клітин кровоносних судин. Методами генної інженерії був отриманий рекомбінантний гірудин і фармацевтичний препарат на його основі [1, 2, 8, 16, 42].

### ***Блокатори запальних реакцій організму***

БАР поліпептидної природи, що слугують інгібіторами ферментів, продукуються різними клітинами організму в ході реакційної відповіді на пошкодження шкіри [1, 8]. Припускають, що речовини даної групи виконують захисну функцію, перешкоджаючи пошкодженню внутрішніх структур МП ферментами, що виділяються у вогнище пошкодження і потрапляють у кишечник із з'єденою кров'ю. Вважають, що в процесі вилучення крові вони блокують прояви захисної запальної реакції організму із метою забезпечення харчування тварини. До них відносять: бделіни, гірустазин, LDТІ, LСІ та егліни.

1. Бделіни — це група поліпептидів із невеликою молекулярною масою [1, 2]. Вони є сильними інгібіторами трипсину, плазміну [1, 8, 16], акрозину сперми [1, 8, 165]. Вони не блокують активність хімотрипсину, тканинних та плазменних калікреїнів, субтилізину [1, 8].

2. Гірустазин належить до тієї ж родини антистазинових інгібіторів серинових протеаз [1, 2, 8], він інгібує тканинний калікреїн, трипсин, хімотрипсин, катепсин G нейтрофілів [125]. Здатність блокувати тканинний калікреїн важлива, бо останній каталізує вивільнення високоактивних кінінів, які через специфічні рецептори на клітинах-мішенях модулюють широкий спектр біологічних активностей, зокрема беруть участь у підтримці нормального кров'яного тиску [1, 2, 8].

3. LDТІ (leech derived tryptase inhibitor) — інгібітор триптази, отриманий із екстракту МП [126]. Триптаза є основним компонентом секреторних цитоплазматичних гранул мастоцитів і приводить до руйнування білків екстраклітинного матриксу. Відома роль триптази при алергічних та запальних реакціях [1, 8].

4. LCI (leech carboxypeptidase inhibitor) — інгібітор карбоксипептидази А. Стійкий у широкому діапазоні рН та температур. Припускають, що він здатний блокувати гідроліз кінінів металопротеїназами у місці укусу шкіри МП, посилюючи індуковане кінінами збільшення кровотоку [1, 2, 8].

5. Егліни — це низькомолекулярні білки, які інгібують активність  $\alpha$ -хімотрипсину, хімази мастоцитів, субтилізіну та нейтральних протеїназ нейтрофілів: еластази та катепсину G [1, 8, 127]. Мають високу стійкість до денатурації та прогрівання. Інгібіторний спектр егліну «с» дозволяє вважати його одним із найважливіших протизапальних агентів [1, 8]. Біологічна цінність еглінів залежить від їх здатності блокувати активність лейкоцитарних протеаз, що вивільняються при запальних реакціях [2, 8].

### *Допоміжні речовини*

БАР, які сприяють стабілізації, захисту, транспортуванню, посиленню дії інших компонентів БАР МП [1, 8]. Наявність у комплексі БАР МП великої кількості ліпідів дозволяє зробити припущення про можливість формування ліпідно-ферментних комплексів, в яких молекули білка чи їхні активні ділянки можуть «екрануватися» ліпідами [1, 8]. В результаті клітини-макрофаги організму не розпізнають чужих білків і не реагують на них. Введені речовини тривало зберігаються в тканинах і, не дивлячись на надзвичайно малу кількість, виявляють значний і тривалий біологічний ефект. Певно, з маскуванням чужорідних білків ліпідами пов'язана майже повна відсутність алергічних реакцій на БАР МП. Про можливість утворення складних комплексів у слині п'явки вперше повідомив Г. І. Ніконов. Він припустив, що в комплексі БАР МП наявні ліпосоми [1, 8]. Ліпосома п'явок — це перший приклад такої структури природного походження. Її компоненти: дестабілаза, стабільний аналог простагліну, інгібітор калікреїну плазми крові та гірудин. Ліпосома може змінювати свою просторову орієнтацію, що залежить від полярності розчинника — це забезпечує її безперешкодне проникнення через мембрану клітини [8, 40]. А. Ю. Барановський та О. Ю. Каменев під час експериментальних досліджень не

виявили в нативній слині ліпосоми. Але виявили, що ліпіди слини мали велику молекулярну масу і являли собою незвично довгі для ліпідів ланцюги, що утворювали спіраль із активними групами на кінцях, що підтверджує можливість формування складних просторових утворень [1, 8].

Окрім вищесказаного БАР МП продукують велику кількість інших активних речовин: колагеназу, кініназу, кініногеназу, ліпазу, простагландини [8, 40], ацетилхолін, гістаміноподібні судинорозширювальні сполуки, які подовжують час кровотечі, знижують утворення рубцевої тканини і спайок (фібриназа, колагеназа) [2, 121], виявлені антибіотики (хлороміцетин) [100], анальгетикоподібні та антитуберкульозні речовини [100, 128, 129]. Оригінальні дослідження І. П. Баскової (2008) доводять наявність у комплексі БАР МП стероїдних гормонів (прогестерону, естрадіолу, тестостерону, кортизону, дегідроепіандростерону) та важливих нейромедіаторів (серотоніну та гістаміну). Так, серотонін регулює харчову поведінку МП, а гістамін викликає вазодилатацію судин мікроциркуляції. Можливо, він разом із серотоніном викликають місцеву алергічну реакцію біля ранки, після укусу МП [8, 130]. Однак, очевидно, що БАР МП та їх спектр все ще залишається недостатньо вивченим і потребує детального аналізу. По-перше недостатньо вивчено схожість БАР МП різних видів МП, яких використовують при ГТ. БАР МП проявляють бактеріостатичну дію на пігментоутворювальні сапрофітні бактерії (*Serratia marcescens*, *Azotobacter chroococcum*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. iodium*) [8, 131]. За рахунок наявності в МП БАР із антимікробною дією (наприклад, гіалуронідаза, колагеназа) [2, 40], а також антибіотика (хлороміцетину) [100]. В організмі МП виявлено пристінкове розміщення бактерії-ендосимбіонту — *A. hydrophila* [2, 181], в результаті чого вони можуть бути джерелом бактеріологічних ускладнень при ГТ [8, 123-132].

В організмі МП наявні гірудіноподібні фактори (HLF): 3 (HLF3) та 4 (HLF4), які належать до нового класу факторів, що походять від п'явки, і є у трьох європейських МП: *Hirudo medicinalis*, *Hirudo verbana* та *Hirudo orientalis*. Молекули гірудину та HLF приймають участь у інгібуванні



тромбіну [133]. Гірудіноподібні фактори (HLF) підклас сполук, отриманих із слини залози МП родів *Hirudo* і *Hirudinaria* [134, 135]. Гірудин може змінювати нирковий інтерстиціальний фіброз через регуляцію TGF- $\beta$ 1 / Smad та NF- $\kappa$ B [136]. Нещодавно повністю було охарактеризовано моноацилгліцеринову ліпазу в МП *Hirudo verbana* [137].

---

## **Основні ефекти від гірудологічного впливу**

### ***Антикоагулянтний ефект***

Каскад згортання крові - це ланцюгова реакція, яка гальмує кровотечу, але БАР МП впливають на різні точки пригнічення дії каскаду згортання. БАР можуть інгібувати згортання, порушуючи цим самим каскад згортання, лізис фібрину, пригнічення тромбіну та згортання крові [102]. У попередньому підрозділі описано, що найсильнішою хімічною речовиною, що виділяється із комплексу БАР МП – є гірудин, який обернено зв'язується з тромбіном [138].

Гірудин, антистатин та гелін - це БАР, які діють як інгібітори тромбіну і розривають ланцюгову реакцію шляхом інгібування фактору згортання Ха. Інгібітор фактора Ха проявляє прямий антикоагуляційний ефект, оскільки він порушує каскади згортання і відіграє важливу роль в лікуванні остеоартриту та ревматоїдного артрити [139]. БАР, такі як гілантен, LDPI, інгібітор комплементу (C1) та егліни відіграють велику роль безпосередньо чи опосередковано у пригніченні згортання крові [140].

Дестабілаза - володіє деградаційною дією на стабілізований фібрин, тому її прийнято оцінювати, як антикоагулянтний засіб. Дестабілаза має здатність розчиняти стабілізований фібрин за допомогою ізопептидолізу ланцюгів  $\alpha$  і  $\gamma$  фібрину, пов'язаних  $\epsilon$  ( $\gamma$  Glu), ізопептидними зв'язками Lys.

---

### ***Протимікробна, знеболююча та протизапальна дія***

БАР хлороміцетин та дестабілаза, які виділяються із слинної залози МП, мають протимікробну активність, оскільки вони знищують клітинні компоненти бактерій [2, 8]. Дестабілаза має бета-глікозидазну активність, яка

безпосередньо порушує бета-1-4 зв'язки, важливі в пептидоглікановому шарі в бактеріальній клітинній стінці [115]. Денатурована форма дестабілази має дозозалежний бактеріостатичний ефект на золотистий стафілокок, синьогнійну паличку та ешерихію коли [141]. Калікреїн-кінінова система підключена до каскаду згортання крові, вона відіграє велику роль у запальних реакціях. Калікреїн-кінінова система - це складна система, що виробляється в різних органах, які включають алкіноген (попередник кініну), калікреїни та брадикініни, вона вважається прозапальною системою. Функцією брадикініну є збільшення проникності судин та зниження болю [142]. Виходячи з цього комплекс БАР МП володіє знеболюючими та протизапальними ефектами. Хімічна кіназа та антистатін можуть інгібувати механізм калікреїн-кінінової системи, який є основним рухом ноціцепторів [143]. Триптази є сериною протеазою в гранулах клітин і їхнє вивільнення викликає запальні реакції у тварин. Ці ефекти сильно пов'язані з калікреїн-кініновою системою, хіміотаксисом, активацією лейкоцитів, вазоактивною дією, що викликають больовий ефект. Хімічні речовини виділяються з гранул тучних клітин, які можуть викликати алергічні та запальні захворювання, такі як астма, анафілаксія та артрит [144]. Однак, БАР які вивільняються зі слини п'явки (СП) можуть пригнічувати дію триптази. У МП похідний інгібітор триптази (LDTI) є інгібітором серинової протеази, який інгібує протеолітичний фермент тучних клітин. Егліни С – це БАР МП, які викликають зниження рівня вільного радикалу кисню в нейтрофілах і запобігають запаленню та руйнуванню тканин [115]. Відіграють важливу роль у класичному шляху системи комплементу [145]. Секреція слинних залоз МП містить інгібітор комплементу (C1), який інгібує обидва каскади згортання та калікреїн-кінінову систему [146]. C1 необхідний, коли пацієнти стикаються з дефіцитом природного інгібітора, ці інгібітори можуть протидіяти небажаній комплемент активації, яка відбувається при анафілактичному шоці та хронічному запаленні. Карбоксипептидаза – це фермент, який бере участь у деградації кініну, який викликає пов'язану з брадикініном запальну реакцію [142].

### ***Загоювання ран та судинорозширювальний ефект***

Під час загоєння ран, перфузія є одним з факторів, що прискорює загоєння, тому БАР, які присутні в СП можуть прискорювати загоєння ран завдяки її здатності до перфузії [147]. СП виділяє судинорозширювальну, гістаміноподібну речовину та інгібітори карбоксипептидази-А, які збільшують приплив крові до місця укусу та зменшують місцевий набряк. Отже, БАР з СП можуть видаляти накопичену кров із рани, яка гальмує надходження свіжої артеріальної крові з киснем. Гіалуронідаза – це фермент, який має антимікробну дію, він збільшує в'язкість інтерстиціальних стінок, що призводить до антибіотичного впливу [148].

### ***Пригнічення функції тромбоцитів***

Формування мосту є одним із механізмів кровотворення, який може зупиняти кровотечу, проте БАР, які присутні в СП, такі як саратин, калін, декорин та апіраза, можуть реагувати проти різних частин мосту або ланцюгів [139]. Калін має здатність інгібувати опосередковану колагеном агрегацію тромбоцитів та адгезію, а також інгібувати залежну від фактора Віллебранда адгезію тромбоцитів до колагену в стінках судин. АДФ відіграє вирішальну роль в агрегації тромбоцитів шляхом активації рецепторів (Gr $\beta$ b-IIIa) та підвищення афінності тромбоцитів до vWf. Фермент апіраза із СП може перетворити АДФ в аденозинмонофосфат, а потім агрегація тромбоцитів блокується внаслідок непрямой інгібуючої дії рецептору колагену та зв'язок АДФ. Тромбін має сильний вплив на активацію тромбоцитів і вивільнення АДФ, проте інгібітор тромбіну виробляється із СП, який має непрямий негативний вплив на функції тромбоцитів. Інша БАР – це саратин, яка може впливати на початкову стадію адгезії тромбоцитів і пригнічувати колаген vWf реакцію [149]. Взагалі хімічні речовини, які секретуються з МП, можуть бути корисними для пригнічення агрегації тромбоцитів шляхом руйнування частинок колагену (ферменту колагенази) та інгібування рецептора тромбоцитів vWf. Цей механізм може лікувати утворення мікротромбів після хірургічних операцій.

## **Ефективність використання біологічно активних речовин медичних п'явок у ветеринарії та сільському господарстві**

З рiстом iнфекцiйних та не iнфекцiйних захворювань у тварин. Вирiс iнтерес до рiзних терапевтичних методiв, якi використовувалися ще в давнину. Ще у стародавнi часи дикi водопiйнi тварини вели активний пошук водоймищ, для споживання та вiдпочинку [2]. В бiльшостi на пасовищах водилися МП, хребетнi тварини входили у водойми, даючи змогу МП харчуватись iхньою кров'ю. Замiсть цього МП зi своєю слиною впускали в iх органiзм великий комплекс БАР. Цим самим, даючи полегшення фiзiологiчного стану. Тварини через деякий час знову поверталися на тiж водойми, для отримання нової порцiї БАР вiд МП [2]. Сучасний стiйливим спосiб утриманням тварин, порушив цей позитивний взаємозв'язок мiж ектопаразитом i iхнiм хазяiном [8, 150]. У результатi чого збiльшився вiдсоток вiрусних, бактерiальних та паразитарних захворювань [8, 151]. Зараз гiрудологiчний вплив (ГВ) широко використовується у ветеринарiї та сiльському господарствi: при лiкуванні рiзних iнфекцiйних захворювань домашнiх i сiльськогосподарських тварин: котiв, собак та коней [8, 152-158,169], для лiкування маститiв i репродуктивної здатності корiв [159-165], лiкуванні судинних захворювань коней, дiабетичнiй нефропатiї та для загоєння ран у щурiв [65, 109, 166-169]. Використання ГВ у кiз, покращує iх загальний стан (пiдвищується апетит, покращується стан шерстяного покриву, зменшується трiщини на рогах та копитах), впливає на продуктивнiсть (вагу тiла, надої) та репродуктивну здатнiсть (кiлькiсть та вагу тiла приплоду) тварин. Пiсля сеансiв ГВ у кiз вiдбувається мiграцiйний перерозподiл лiмфоцитiв кровi з тимчасовим iх депонуванням у мiсцях приставки МП, пiдвищується фагоцитарна активнiсть нейтрофiлiв (ФАН) кровi [2, 8, 151].

ГВ ефективно корегує перебiг постпологових iнволюцiйних процесiв i пiдвищує репродуктивну здатнiсть у корiв. У iх кровi спостерiгається збiльшення кiлькостi еритроцитiв та гемоглобiну, базофiлiв, еозинофiлiв, альбумiнiв,

підвищення ФАН, бактерицидної та лізоцимної активності; дещо зменшується фагоцитарний індекс (ФІ), вміст лейкоцитів, сегментоядерних нейтрофілів, тромбоцитів; уповільнюється швидкість згортання крові [2, 8, 160].

Після ГВ зменшуються гематоми у собак [156], зменшується тиск рідини в пошкоджених тканинах тварин [170], запалення, дисплазія стегна і ліктювих суглобів, лікуються захворювання сухожилів, зв'язок і фасцій, хребців та рубців [117], а також інші захворювання домашніх тварин (табл. 1.1).

**Таблиця 1.1. Лікування захворювань тварин за допомогою гірудологічного впливу**

Тварини	Коні	Коти	Собаки
Захворювання	лихоманка	післяопераційні рани	післяопераційні рани
	ламініт	Дископатії	остеоартрит хребта
	тендініт	Екзема	дископатії
	теносиновіт	Абсцеси	синдром кінського хвоста
	атаксія	напруження зв'язків	дисплазія стегна та ліктів
	міозит	дисплазія коліна	неврит
	спінальний остеоартрит	Неврити	екзема вухів
	артрит плечового суглобу	Мастит	погане загоєння ран, післяопераційні рубці, тендініт, теносиновіт, мастит

### **Використання біологічно активних речовин медичної п'явки у медицині при профілактиці та лікуванні різних захворювань**

Із-за наявності в організмі МП міні біофабрики з більш як 100 БАР, які володіють багатьма терапевтичними ефектами, що було описано більш детально в попередніх підрозділах, ГТ та фармакологічні препарати на основі секрету слинних залоз (ССЗ) МП ефективно використовують із метою профілактики та лікуванні багатьох захворювань [2, 30, 33, 178]: лейоміоми шкіри [27], псоріазу [28, 29]; в кардіології — при лікуванні серцевої недостатності [30], гіпертонічної хвороби [31], інфекційного міокардиту [32], стенокардії [33]; в офтальмології — для лікування глаукоми, проліферативної ретинопатії [34-38], геморагічно-фібриноїдного синдрому [8, 39];

в оториноларингології — при гострій сенсоневральній приглухуватості [40, 41], гострих та хронічних захворюваннях середнього та внутрішнього вуха [2, 42-44]; в травматології — при радикулопатіях [45], артритах [46-48], остеохондрозах [49, 50], артрозах [51]; у невропатології — при цереброваскулярних захворюваннях [8, 52-57]; у гінекології — при ендометріозі, міомі матки, хронічних запаленнях придатків [2, 58-60]; у терапії — при нефритах [61], діабетичній стопі [62]; в ендокринології — при діабеті [63]; в хірургії — при лікуванні тромбофлебітів [64, 66], варикозу та інших судинних розладах [2, 67-72]; в стоматології — при хронічних та дистрофічних захворюваннях слинних залоз [73], при стоматитах, пульпітах та ін. [8, 15, 73-83]. Також ефективно ГТ застосовується у психотерапії [84-86], для усунення проявів алергії [87]. В практиці зарубіжних країн МП широко використовують при трансплантаціях із метою усунення венозного застою, лікуванні захворювань нервової системи [8, 88-99], до того ж із превентивною антибіотикотерапією, в реконструктивній хірургії [128-105]. ГТ нещодавно почали застосовувати в терапії раку [2, 100, 105, 106, 171-174], лікуванні інфекційних захворювань [107, 108, 110], чоловічому та жіночому безплідді [2, 111, 112], чоловічому пріапізмі [113], діабеті, захворюванні передміхурової залози, бронхіальній астмі, еритематозному вовчаку, для профілактики онкологічних захворювань [2, 8, 45, 114].

ГТ може проявляти протизапальну, бактеріотропну та імуотропну дії [8, 16, 23, 24]. В сучасній літературі існують поодинокі та суперечливі роботи, що стосуються імуотропного впливу ГТ [8, 70, 175]. Комплекс БАР МП стимулює ФАН та антикомплементарну активність секрету [1, 16, 175], активує лімфоцити периферичної крові [2, 8, 18], нормалізує цитокіновий профіль [8, 17, 21, 22].

Використання ГТ при захворюваннях, що супроводжуються вторинними імунодефіцитними станами, викликає активацію попередньо знижених фагоцитарних показників моноцитів/макрофагів до нижньої межі норми та підвищує функціональну активність системи фагоцитуючих макрофагів [2, 8,

12]. ГТ у педіатрії застосовується при лікуванні ускладнень важких форм перитоніту [21], в результаті чого знижується концентрація ФНП- $\alpha$ , швидко нормалізується загальний стан хворого, температура тіла, показники крові, зменшується тривалість лікування [2, 8, 21].

Після сеансів ГТ у хворих із хронічними запальними процесами у вусі покращується слух, за рахунок загальної дії БАР ССЗ МП на організм людини, знижується можливість рецидивів. ГТ здійснює ефективну знеболюючу, протизапальну, протинабрякову та антибактеріальну дії, а також проявляє загальну дію на організм людини при гострому зовнішньому дифузному отиті, нейросенсорній приглухуватості, вушних шумах, травмах вушної раковини [2, 8, 70].

ГТ ефективна при рецидивуючих фурункулах носа, які супроводжуються системною ендотоксемією з розвитком гнійно-септичних, тромбогеморагічних ускладнень. Ендотоксин грамнегативної флори кишечника є інтегральним чинником, на якому перетинаються імунна та гемокоагуляційна системи. Комбінація місцевого та загального застосування сеансів ГТ дозволяє посилювати найважливіший фактор дії МП — гуморальний, за рахунок викиду в кров БАР. Дія ГТ при рецидивуючих фурункулах носа найбільш значна у відношенні до болю, реактивного набряку та гіперемії в ділянках запалення, підвищення температури тіла, нормалізації підвищеної здатності крові до згортання, позитивної динаміки антиоксидантного потенціалу, показників активності протеаз та інгібіторів протеолізу [2, 8, 176].

Комплексне використання сеансів ГТ та імуномодулюючих препаратів показує позитивний ефект при лікуванні хронічного тонзиліту асоційованого з синдромом вторинного імунодефіциту у вигляді частих загострень, після сеансу знижується кількість рецидивів. МП при цьому виконує функцію деконгестії, а також виділяє комплекс БАР, які мають протизапальну, імуномодулюючу та деблокуючу мікроциркуляційну дії. Після сеансів ГТ відновлюється фагоцитарна та секреторна функції поліморфноядерних лейкоцитів, а також відбувається незначне зниження кількості зрілих імунних клітин — CD3+,

CD4+, CD8+ із підвищенням CD20+ лімфоцитів (кластер диференціації (CD)). Підвищується спонтанна проліферація мононуклеарних клітин периферичної крові з одночасним зростанням стимульованої, що веде до деякого збільшення коефіцієнту стимуляції. Знижується концентрація ФНП- $\alpha$ , ІЛ-6, ІЛ-4 у сироватці крові. Також знижується спонтанна продукція ІЛ-1 та ФНП- $\alpha$  в культурі мононуклеарних клітин, а стимульована навпаки зростає [2, 8, 19].

ГТ спонукає продукуванню інтерлейкінів (ІЛ) у хворих із хронічними захворюваннями слизової оболонки рота, в результаті чого, стимулюються клітинні та секреторні механізми місцевого захисту, а потім і системний імунітет. У хворих на синдром печії слизової оболонки рота попередньо знижені показники місцевого імунітету підвищуються після сеансів ГТ із одночасним позитивним клінічним ефектом і подовженням періоду ремісії [2, 8, 20]. Після курсу ГТ у хворих із верхівковим періодонтитом виражено БАР МП проявляють дезінтоксикаційний, протизапальний, протибольовий та деконгестивний впливи.

Протизапальний ефект після сеансів ГТ підтверджується даними цитологічного дослідження: зниженням показників цитозу та абсолютного вмісту нейтрофілів; підвищення вмісту лізосомально-катионних білків у нейтрофілах, що свідчить про нормалізацію стану їх кисневонезалежної системи та активацію механізмів місцевого неспецифічного імунного захисту [2, 8, 13].

ГТ проявляє лімфостимулюючий вплив на інтерстиціальний гуморальний транспорт і лімфатичний дренаж тканин при реабілітації хворих ішемічною хворобою серця середнього та похилого віку [8, 14].

ГТ при лікуванні суглобової форми ревматоїдного артриту показала позитивний її вплив на стан ендотеліальної функції, антиоксидантного захисту, процесів ліпопероксидації та деяких цитокінів і клінічний перебіг захворювання. До сеансів ГТ у хворого відмічалось погіршення стану ендотеліальної функції, збільшення продукції прозапальних (ІЛ-1 $\beta$ , ФНП- $\alpha$ ) і зниження концентрації протизапального цитокіну (ІЛ-4) [2, 8, 22].



ГТ ефективна при остеоартриті колінного суглоба. Протизапальні речовини, які містяться в ССЗ МП, пригнічують цитокіни та інші фактори, які викликають подальше виродження суглобу. Окрім того, ССЗ МП також містить знеболюючі речовини, які проявляють тимчасовий та довгостроковий знеболюючий ефект [2, 8, 129]. ССЗ МП містить і інші БАР, такі як вазодилататори, які призводять до витікання крові в місці укусу, що допомагає усунути патологічні метаболіти, медіатори запалення і підвищити доступність лікувальних та поживних речовин до місця пошкодження. Як результат, БАР МП зменшують запалення при остеоартриті коліна, дозволяють зняти набряки і жорсткість за рахунок зменшення застою крові; сприяють надходженню поживних речовин та БАР, щоб досягти ураженої ділянки, покращують циркуляцію крові; зменшують біль у колінному суглобі, захищають його від подальшого пошкодження через деякі медіатори запалення [2, 8, 129].

### **Можливість використання гірудотерапії при профілактиці, допоміжному лікуванні та швидкому реабілітаційному відновленні при Covid-19**

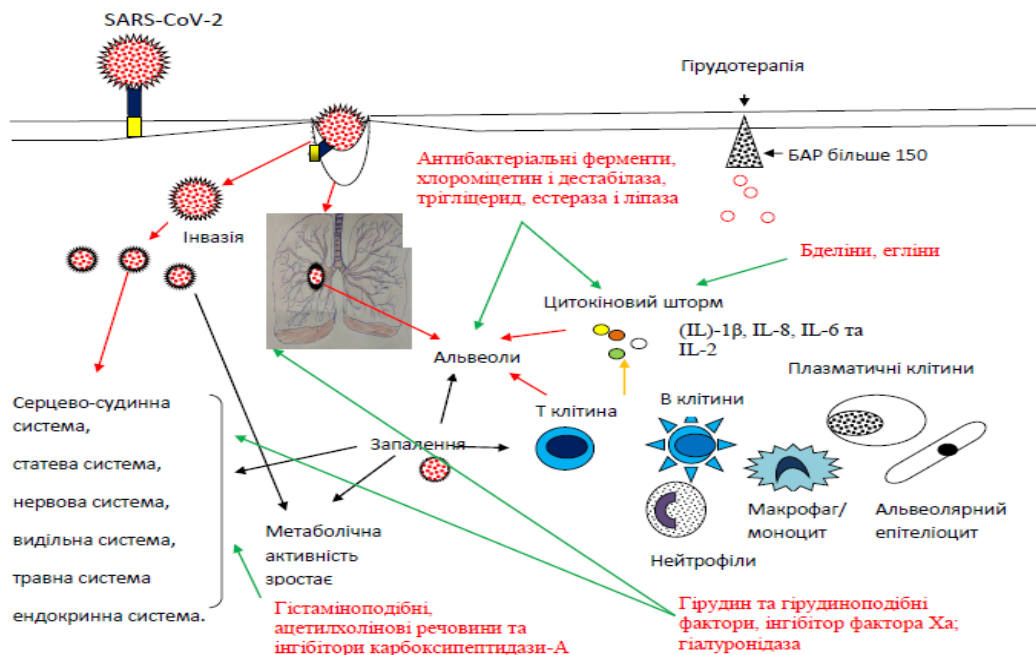
В теперішній час зросла кількість хворих на дуже небезпечне інфекційне захворювання Covid-19, яке спричинене коронавірусом SARS-CoV-2. При проведенні доклінічних та клінічних експериментальних досліджень були виявлені його етіологія, епідеміологія та патогенез [177, 178]. В легкій формі дане захворювання проявляється в основному інфекцією дихальних шляхів, яка характеризується лихоманкою, кашлем, задишкою, втомою, болем у горлі, нежиттю, нудотою та блюванням, у більшості випадках втратою нюху та смаку [179-183]. У тяжких випадках розвивається прогресуюча пневмонія та утворюються тромбози із-за порушення коагуляції, порушується фізіологічна регуляція імунної системи. Надалі уражається ендотелій легень, виникає мікросудинний тромбоз та відбувається альвеолярне пошкодження. Після чого в більш тяжкій формі виникає септичний шок, який проявляється уже пошкодженням усіх важливих органів систем [180-184]: легенів, серця,

стравоходу, нирок, сечового міхура, клубової кишки. Інфекційне захворювання Covid-19 визнане Всесвітньою організацією охорони здоров'я, як найнебезпечніше інфекційне захворювання із швидким розповсюдженням [185].

Зараз створено різні вакцини: BioNTech, Pfizer; CoronaVac; Johnson & Johnson; Moderna; AstraZeneca та ін., які зменшують відсоток зараження та ускладнення після Covid-19. Проводяться дослідження з пошуку синтетичних та природних речовин, які можуть впливати на коронавірус SARS-CoV-2. Запроваджене використання лікарських рослин (*Curcuma angustifolia*, *Cuminum cyminum*, *Allium sativum*, *Terminalia bellirica*, *Cinnamomum species*, *Piper nigrum*, *Vitis vinifera*), які мають властивості підвищувати імунітет та протівірусну дію і можуть бути використані при допоміжному лікуванні Covid-19 [186]. Згідно попередніх підрозділів із тваринного організму широко досліджено терапевтичні ефекти БАР МП, які забезпечують антитромботичну, тромболітичну, антигіпертензивну, антиатерогенну, антигіпоксичну, регенераційну, антимікробну, антивірусну, імуномодулюючу та анальгезуючу дії, практично без протипоказань та побічної дії [1, 15, 133, 166, 187, 188].

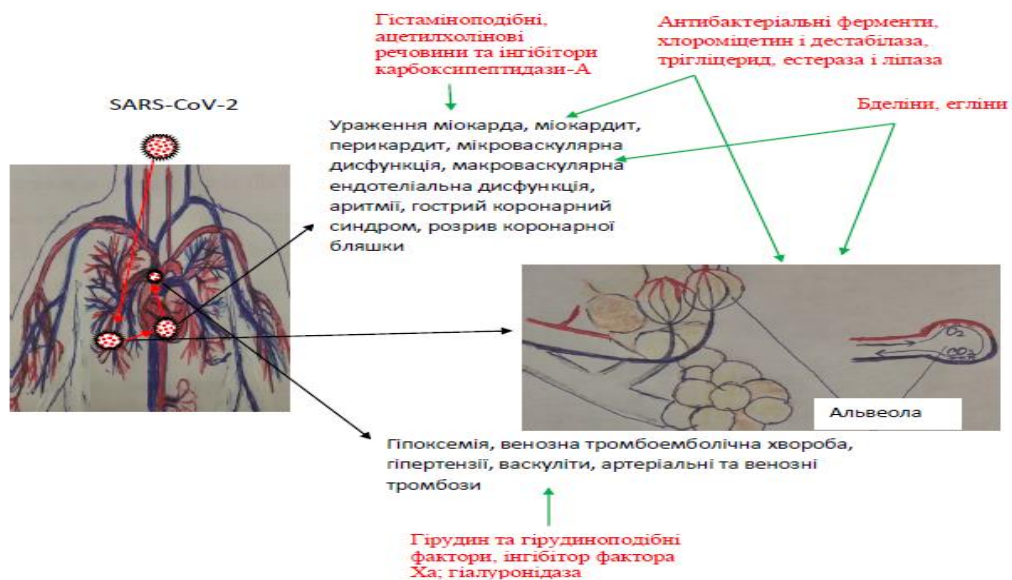
### ***Відновлення серцево-судинної системи при Covid-19***

Інфекційне захворювання Covid-19 в першу чергу вражає органи дихання рис. 1.1. Потім вірус розходить по всьому організму через кровеносні судини та вражає інші системи організму рис. 1.1., але найчастіше викликає ускладнення з боку серцево-судинної системи рис. 1.2: міокардити, гостру серцеву недостатність, аритмії, артеріальні гіпертензії, тромбози [177, 178, 185, 189] рис. 1.2.



**Рис. 1.1. Схема загального патогенезу Covid-19 та можливість використання грудотерапії (біологічно активних речовин).**

Примітки: червоні стрілки – потрапляння вірусу та його розповсюдження; чорні стрілки – пошкодження які викликає вірус; зелені стрілки – направлення на відновлювальні ефекти від біологічно активних речовин медичної п’явки.



**Рис. 1.2. Патогенез ураження серцево-судинної системи та можливість лікування за допомогою грудотерапії (біологічно активні речовини).**

Примітки: червоні стрілки – потрапляння вірусу та його розповсюдження; чорні стрілки – пошкодження які викликає вірус; зелені стрілки – направлення на відновлювальні ефекти від біологічно активних речовин медичної п’явки.

В результаті чого людина може навіть загинути.

Згідно попередніх підрозділів серед БАР МП є речовини, які здатні відновлювати серцево-судинну систему. До них відносяться: гірудин – це високоспецифічний інгібітор ферменту тромбіну, який блокує всі відомі реакції, активатором яких виступає тромбін.

За деякими аспектами, гірудин має перевагу перед найбільш часто використовувемими у клінічній практиці фібринолітиками та антикоагулянтами, оскільки не впливає на активність інших білків плазми [190].

Гірудин, гірудиноподібні фактори та подібні до нього препарати є одними з найперспективніших антикоагулянтів та розглядаються як альтернатива синтетичному репарату - гепарину рис. 1.1 [190]. Інтерес до унікальним властивостям ферменту підтверджується ефективним його використанням при різних тромботичних станах, включаючи тромбози коронарних, мозкових та інших артерій рис.1.2 [187-188, 190].

Іншою речовиною є калін, який також пригнічує згортання крові [190]. Наступною БАР є дестабілаза, яка розчиняє фібринові згустки та пригнічує утворення тромбу. СП також містить БАР інгібітор фактора Ха, який стримує коагулюючу дію фактора згортання, а також містить гіалуронідазу, яка покращує в'язкість інтерстиціальної рідини [35]. Містить гістаміноподібні, ацетилхолінові речовини та інгібітори карбоксипептидази-А [35], які володіють судинорозширювальними ефектами рис.1.1 [57].

ГТ сприяє зменшенню набряку і болю, розчиненню тромбів при варикозному розширенню вен [168, 191] та геморої [192], при лікуванні різних форм гіпертонії, особливо при її сполученні з проявами церебрального атеросклерозу, при лікуванні кардіалгій, стенокардії [33], при комплексному лікуванні серцевої недостатності [193, 194], гіпертонічній хворобі, інфекційному міокардиті, ішемічній хворобі серця, постінфарктному кардіосклерозі при лікуванні тромбофлебітів [194] та інших судинних розладах [5, 67-70].

Заслуговують уваги нещодавно отримані наукові данні [196], щодо ефективності ГТ при різних серцево-судинних захворюваннях. Лікувальний ефект згідно цим даним настає з 3-5 сеансу і продовжується від 3 до 8 місяців. Відбувається зниження протромбінового індексу, збільшення часу згортання крові, зменшення в'язкості крові за рахунок зміни реологічних властивостей [196].

Після сеансів ГТ достовірно знижується гемоглобін та кількість еритроцитів. Причому ці дані простежуються у хворих зі значно перевищуваними показниками норми (150-180 г/л). Ці зміни можуть свідчити про гомеостатичну дію БАР МП [196]. В середньому знижується протромбіновий індекс на 12,3 % ( $p < 0,05$ ), при цьому час згортання крові збільшується на 41,4 % ( $p < 0,05$ ) [196].

Таким чином, згідно цим результатам ГТ призводить до гальмування активації ключових факторів внутрішнього механізму згортання крові (де задіяні калікреїн, Ха, тромбін) та забезпечення гіпокоагуляції.

МП виділяють бделіни, які інгібують плазмін та егліни, що гальмують активацію альфа-антитрипсину, тобто ці речовини гальмують та активують фібриноліз [196].

ГТ знижує вміст глюкози в крові, що свідчить про нормалізацію функції ендокринних залоз. При артеріальній гіпертензії та артеріальній гіпертонії ГТ знижує середньодобовий систолічний артеріальний тиск та зменшує величину діастолічного артеріального тиску [196].

У ветеринарії ГВ широко використовується при лікуванні судинних захворювань у коней та інших сільськогосподарських і домашніх тварин [156-158, 197]. Згідно аналізу попередніх підрозділів та вище згаданих експериментальних доклінічних та клінічних даних учених, гірудотерапія ефективно зарекомендувала себе в медицині та ветеринарії, при лікуванні серцево-судинних захворювань, які можуть виникнути, як ускладнення після перенесеного Covid-19.

## Здатність БАР медичної п'явки відновлювати органи дихання після Covid-19

Один з несприятливих сценаріїв хвороби, викликаной вірусом SARS-CoV-2 є пневмонія [198].

Вірус SARSCoV-2 інфікуючи пневмоцити, спричиняє їх десквамацію в альвеолах, в результаті чого у них відбувається набряк та кровотеча, порушується газообмін рис. 1.3, що призводить до дихальної недостатності.

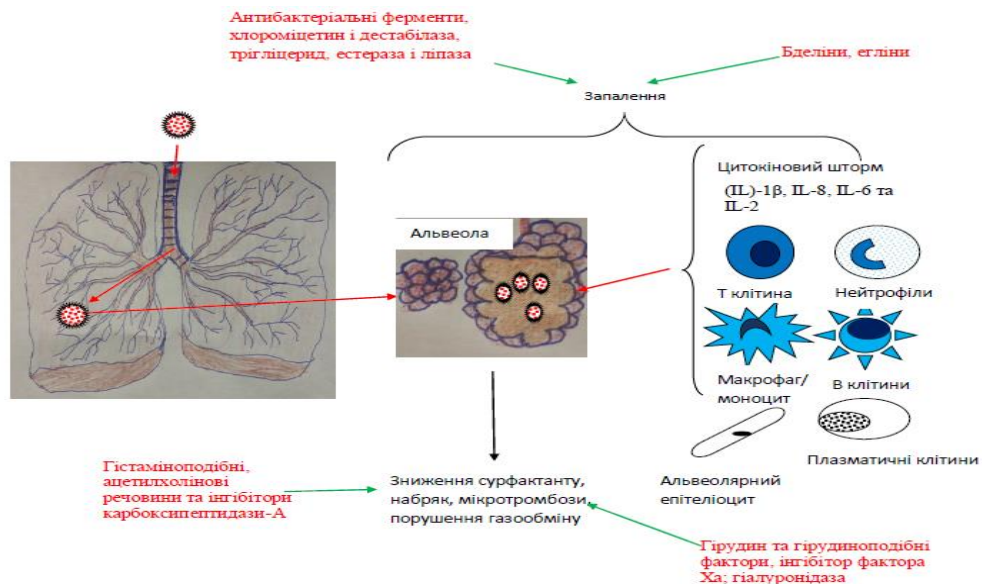


Рис. 1.3. Схема ураження легень Covid-19 та можливість їх функціонального відновлення після гірудотерапії.

Примітки: червоні стрілки – потрапляння вірусу та його розповсюдження; чорні стрілки – пошкодження які викликає вірус; зелені стрілки – направлення на відновлювальні ефекти від біологічно активних речовин медичної п'явки.

Одночасно зменшується кількість сурфактанту, а, відповідно, знижується здатність легень розширюватись і стискатися під час акту дихання, що може призвести до колапсу легень під час видиху. У міру заповнення альвеол рідиною, наростає дихальна недостатність, а в більш тяжкому випадку виникає інтоксикація, яка призводить до септичного шоку. Дуже тяжке запалення легень розвивається через інтенсивну цитокінетичну відповідь на SARSCoV-2. Прозапальні цитокіни і хемокіни, в тому числі IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  рис 1.1. та рис. 1.2, притягують запальні клітини до місця інфекції рис. 1.1. та рис. 1.3.

Нейтрофіли і цитотоксичні Т-клітини, поряд із цитокінами, спричинюють пошкодження тканин легень [198], включаючи підвищення проникності судин і стимуляцію легеневого фіброзу [199].

Згідно інформації з попередніх підрозділів ГТ широко використовується при лікуванні багатьох захворювань органів дихання: хронічному бронхіті, ларингіті, бронхіальній астмі, хронічній пневмонії, хронічних синуїтах, оскільки має багато БАР, які здатні боротися із запаленням та інтоксикацією. Серед них: бделіни, які пригнічують трипсин та володіють протизапальною дією, плазмін і акроцин рис. 1.2; антибактеріальні ферменти – це БАР, які зміцнюють імунну систему для боротьби з подальшою інфекцією; інші протизапальні засоби, які допомагають зменшити запалення, завдяки чому кров може вільно проходити в судини та постачати кисень по всьому організму рис. 1.1 [200]. БАР МП проявляють детоксикаційну дію. Наприклад, БАР трігліцерид, який володіє детоксикаційною дією, естераза і ліпаза беруть участь у розщепленні жирів, знижують рівень холестерину, а також володіють детоксикаційною дією [153], інші дві важливі БАР хлороміцетин і дестабілаза, які мають антимікробну активність. Дестабілаза володіє  $\beta$ -глікозидазною активністю, яка безпосередньо порушує  $\beta$ 1–4 зв'язки, необхідні в пептидоглікановому шарі стінок бактеріальних клітин. Навіть дозозалежний бактеріостатичний ефект демонструє ненасичена форма дестабілази на *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* та *Pseudomonas aeruginosa*. Хлороміцетин – потужний антибіотик, що міститься у СП. Крім того, теромізін, пептид В і теромацин також проявляють антибактеріальний ефект [201-203] рис. 1.1 та рис. 1.2. Дослідження учених доводять, що сеанси ГТ сприяють відновленню легень та частоти дихання у пацієнтів зрілого та старечого віку після перенесеної коронавірусної хвороби ускладненою хронічним бронхітом та бронхіальною астмою [204].

Згідно аналізу попередніх підрозділів та вище згаданих даних, щодо потужного комплексу БАР, гірудотерапія може ефективно застосовуватися як допоміжний засіб для відновлення органів дихання під час запалення при Covid-19.

## ***Відновлення імунної системи гірудотерапією при Covid-19***

Для боротьби з Covid-19 задіяні як вроджена, так і адаптивна ланки імунної системи. Знижений імунітет призводить до тяжкої і множинної патології легень, порушення згортання крові, тромбоемболічних явищ, серцево-судинним ускладненням, більш детально це описано в попередньому підрозділі [205]. Нормальні альвеолярні проміжки заповнені альвеолярними макрофагами, гранулоцитами, базофілами та еозинофілами [206]. Альвеолярні макрофаги та дендритні клітини ключові антигенпрезентуючі клітини в легенях рис. 1.1. та рис. 1.2, де разом із слизовою оболонкою та комплементом створюють бар'єр для вірусних інфекцій. SARSCoV-2 проникає в клітини і викликає їх смерть. Апоптотичні клітини поглинаються легневими макрофагами та лейкоцитами [207], запускаючи прозапальну передачу сигналів, збільшується секреція цитокінів, підвищуються прозапальні фактори – фактор некрозу пухлин (ФНП)- $\alpha$ , інтерлейкін (IL)- $1\beta$ , IL-8 та IL-6 рис. 1.1. та рис. 1.2 [208]. Підвищена концентрація цитокінів у мікросередовищі легень може призвести до ураження легень. Зростає виробництво противірусних інтерферонів I типу (ІФН) [209]. ІФН типу I продукуються дендритними клітинами. Вони стимулюють фагоцитоз у макрофагах, активують Т-хелперні клітини [210]. Після зараження легневі дендритні клітини мігрують до лімфатичних вузлів для представлення оброблених антигенів SARS-CoV-2. Індукується утворення вірусспецифічних антитіл В-клітинами і CD8<sup>+</sup> (цитотоксичними) Т-лімфоцитами. Як CD4<sup>+</sup>, так і CD8<sup>+</sup> Т-клітини відіграють дуже важливу роль. CD4<sup>+</sup> Т-клітини сприяють активації В-клітин і є необхідними для вироблення нейтралізуючих антитіл. CD8<sup>+</sup> Т-клітини запускають апоптоз інфікованих клітин. Ці різноманітні Т-клітинні відповіді здатні знищити інфекцію SARSCoV-2 [211]. При більш тяжкому стані відбувається імунодефіцитний стан та підвищується запальний процес. Він характеризується посиленням залученням запальних клітин, що викликає цитокіновий шторм, що характеризується підвищенням ІЛ-6 та TNF- $\alpha$  [212]. IL-8 залучає нейтрофіли, в результаті чого уражаються легені [213]. Активовані нейтрофіли сприяють згортанню крові. Цитокіни також викликають зменшення проникності судин та набряк. Збільшується кількість С-реактивного



білку та інших факторів запалення, а також, відбувається лімфопенія пов'язана або з апоптозом цитокінами, або з зараженням Т-клітин вірусом SARS-CoV-2 [214]. Знижується кількість натуральних кілерів [215]. Підвищується кількість моноцитів CD14+/CD16+, популяція макрофагів FCN1+ [216]. Згідно літературним даним попередніх підрозділів ГТ здатна відновити гомеостатичний стан імунної системи при Covid-19, за рахунок імуномодуляторного ефекту. Основну роль у відновленні імунної системи грає БАР апіраза, яка володіє імуномодельюючою дією, бделіни та егліни, які мають протизапальну дію. Як описано в попередніх підрозділах ГТ може забезпечувати активацію попередньо знижених фагоцитарних показників моноцитів/макрофагів до нижньої межі норми та підвищувати функціональну активність системи фагоцитуючих макрофагів, що може бути пов'язано із БАР дестабілазою, яка здатна впливати на функціональну активність різних клітин: ендотеліоцитів, лімфоцитів, тромбоцитів, макрофагів та ін. [8, 12]. ГТ здатна відновлювати вміст цитокінів у крові: із зниженням попередньо підвищених рівнів прозапальних ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-2, ФНП- $\alpha$  та нормалізувати рівень протизапального ІЛ-4 рис. 1.2, відповідно з цим нормалізувати і співвідношення між прозапальними й протизапальними цитокінами, що може бути пов'язано з активацією БАР бделінів та еглінів [8, 16]. При лікуванні перитоніту ГТ знижується рівень ФНП- $\alpha$  [20]. Комплексне використання ГТ та імуномодулюючих препаратів супроводжує відновлення фагоцитарної та секреторної функцій поліморфноядерних лейкоцитів, а також деяке зниження кількості зрілих імунних клітин — CD3+, CD4+, CD8+ і підвищення CD20+ лімфоцитів. Підвищення спонтанної проліферації моноклеарних клітин периферичної крові і зростання стимульованої, що веде до деякого збільшення коефіцієнту стимуляції. Знижується концентрація ФНП- $\alpha$ , ІЛ-6, ІЛ-4 у сироватці крові, спонтанна продукція ІЛ-1 та ФНП- $\alpha$  в культурі моноклеарних клітин, а стимульована навпаки зростає [8, 217]. ГТ здійснює стимулюючий вплив у першу чергу на клітинні та секреторні механізми місцевого захисту, а потім і на системний імунітет [19]. ГТ здійснює виражений дезінтоксикаційний, протизапальний, протибольовий та деконгестивний вплив.

Протизапальна дія ГТ при цьому підтверджується зниженням показників цитозу та абсолютного вмісту нейтрофілів; підвищенням вмісту лізосомально-катіонних білків у нейтрофілах, що свідчить про нормалізацію стану їх кисневонезалежної системи та активацію механізмів місцевого неспецифічного імунного захисту [8, 218]. ГТ володіє лімфостимулюючим впливом, позитивно впливає на інтерстиціальний гуморальний транспорт та лімфатичний дренаж тканин [219]. ГТ позитивно впливає на стан ендотеліальної функції, проявляє антиоксидантний захист, процеси ліпопероксидації та деяких цитокінів [21]. Використання ГТ у ветеринарії при аналізі крові кіз, реєструє міграційний перерозподіл лімфоцитів крові з тимчасовим їх депонуванням у місцях приставки МП, підвищення ФАН [151]. ГТ у крові корів сприяє статистичному значимому збільшенню кількості еритроцитів та гемоглобіну, базофілів, еозинофілів, альбумінів, підвищенню фагоцитарної активності лейкоцитів, бактерицидної та лізоцимної активності; дещо зменшенню ФІ, вміст лейкоцитів, сегментоядерних нейтрофілів, тромбоцитів; уповільненню швидкості згортання крові [160]. Згідно прояву вищезгаданих ефектів та інформації попередніх підрозділів ГТ може ефективно використовуватися для відновлення та підтримки імунної системи щодо Covid-19.

### ***Застосування гірудотерапії при інших патологіях та захворюваннях***

Covid-19 може викликати порушення функцій усіх важливих органів та систем [220]. Тому пошук інших терапевтичних ефектів БАР мають теж важливе значення для зменшення ризиків ускладнення від даного захворювання, а ГТ має багато біологічних та терапевтичних ефектів, які можуть сприяти їх уникненню. Ефективне використання ГТ доведено при лікуванні різних захворювань у всіх галузях медицини [221] та представлено більш детально в попередніх підрозділах.

## **Протипоказання та виникнення побічних ефектів після гірудотерапії**

### ***Протипоказання до гірудотерапії***

Перед призначенням курсу ГТ обов'язково показано консультацію лікаря фізіотерапевта, який має спеціальну підготовку з лікування МП, оскільки перед початком лікування важливо оцінити не тільки показання до цього виду немедикаментозної терапії, але і виключити протипоказання, оцінити можливі ризики та індивідуальну непереносимість.

*До основних протипоказань до гірудотерапії відносяться:*

1. Захворювання, що супроводжуються порушеннями згортання крові (гемофілія та геморагічні діатези);
2. Анемії (коли рівень гемоглобіну нижче 100 г/л);
3. Лейкози;
4. Кахексія;
5. Ерозивно-виразкові ураження та пухлини шлунково-кишкового тракту;
6. Гострі лихоманкові захворювання з невідомою етіологією;
7. Підгострий бактеріальний ендокардит;
8. Активні форми туберкульозу;
9. Стан гострого психічного збудження;
10. Стан алкогольного сп'яніння;
11. Різне виснаження;
12. Артеріальна гіпотонія;
13. Вагітність;
14. Стан після операцій на мозку та хребті;
15. Індивідуальна непереносимість медичних п'явок (спостерігається дуже рідко) [222].

### ***Побічні ефекти від гірудотерапії***

ГТ практично не має побічних ефектів при правильному використанні з дотриманням усіх санітарних норм. Але згідно літературному аналізу вченими

виявлено деякі негативні випадки після ГТ: описаний випадок бешихового запалення [223], випадок розвитку червоного плоского лишая [224], серія випадків виникнення шкірної псевдолімфоми [225], випадок гемартрозу [226], описано розвиток неоклюзійної мезентеріальної ішемії [227], орбітального целюліту [228], синдрому Коуніса [229], тривалі кровотечі, лімфоїдна гіперплазія, періорбітальний целюліт [230- 232] та формування шрамів на місці укусу, а також різні алергічні реакції, включаючи анафілактичний шок [233].

У шлунково-кишковому тракті п'явок мешкають кілька видів бактерій, головним чином *Aeromonas hydrophila* та *Aeromonas veronii biovar sobria*, які допомагають їм перетравлювати кров та можуть інфікувати [234]. Для профілактики розвитку інфекції після пластичних операцій у США де використовують МП рекомендують проводити курси антибіотикотерапії препаратами фторхінолонового ряду (наприклад, ципрофлоксацин), проте існують резистентні до деяких антибіотиків штами бактерій [235].

Зафіксовані випадки зараження резистентними штамми, які пов'язують із застосуванням антибіотика енрофлоксацину (метаболітом якого є ципрофлоксацин) у ветеринарії у тварин, кров'ю яких годують МП [236].

### **Методи отримання комплексу біологічно активних речовин з медичних п'явок**

При аналізі попередніх підрозділів зрозуміло, що лікувальні ефекти ГТ різноманітні, оскільки мають такий великий комплекс різноманітних БАР. Згідно представлених результатів у попередніх підрозділах стає зрозуміло, що БАР МП мають різну хімічну будову: ліпідну, білкову та вуглеводу. В цьому виникає проблема отримати їх комплекс БАР без значних втрат, що сприяє розробленню та доповненню різних методів отримання БАР МП. Згідно літературного огляду нижче представлено найбільш діючі методи отримання БАР МП на цей час:

1) отримання БАР МП із живих тварин без ліофілізації та подрібнення за допомогою полівінілового спирту та хлориду магнія [237];

2) оброблення МП надвисокочастотним випромінюванням у мікроволновій пічі, з упаровуванням до сухої речовини їх витяжки, яка виділилася із їх тіла [238];

3) екстрагування продукту, отриманого з МП, підданій попередньому голодуванню і заморожуванню, при цьому заморожену МП подрібнюють, екстрагують охолодженим до  $+4^{\circ}\text{C}$  розчином етилового спирту у співвідношенні 1:1 і виділяють рідку фазу, отриманий екстракт доводять рН до нейтральних значень [239];

4) отримання комплексу БАР за рахунок заморожування п'явок, ліофілізації з подальшим подрібненням, розведенням водою, підкисленням до рН 5,8 - 7,0, прогріванням на киплячій водяній бані 3 - 15 хв з подальшим збиранням фільтрату [240].

5) витримування МП в режимі активного голодування 4 місяці і більше, промивання, заморожування та подрібнення у гомогенну масу, змішування отриманої маси з водним розчином полівінілового спирту та хлориду магнію в певному співвідношенні, висушування в умовах, за яких не відбувається денатурація білка до утворення еластичної плівки [241].

6) витримування МП у режимі активного голодування до повного звільнення кишкового каналу від крові, промивання, грубо подрібнювання, ліофільне висушування, потім подрібнення до ультратонкого порошку ( $10^{-9}$  м), з якого виготовляють лікарські форми [242].

7) просушування МП, фрагментування, розтирання з додаванням фізіологічного розчину у співвідношенні 1:10, екстрагування у холодильник, з наступним центрифугуванням на холоді та фільтрацією через стерильні бактеріологічні фільтри. Розглянутий метод порівняно з іншими дозволяє найбільш ефективно зберегти комплекс БАР МП, без значних втрат, оскільки не має різних розчинників, не піддається випромінюванню та нагріванню [243].

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### Матеріал, що використовувався у роботі

*Лабораторні щури.* Усі експериментальні дослідження було виконано на білих нелінійних лабораторних щурах. У дослідженнях використано 480 нелінійних статевозрілих щурів: 180 самиць (віком 4 місяців, середньої ваги  $210 \pm 15,5$  г), 300 самців (віком 6 місяців, середньої ваги  $270 \pm 20,5$  г), та їх приплоду ( $n=1080$ ) в динаміці онтогенезу: на 1, 15, 30, 45 та 60 добу. Терміни проведення досліду приплоду були обрані з урахуванням загальноновизнаної класифікації вікових періодів у щурів. Так, 1-5 доба життя відповідає періоду новонародженості, 6-21 доба - підсисному періоду, 22-50 доба - періоду становлення статевої зрілості, і нарешті, з 60 доби - період статевої зрілості [2, 244]. Для дослідження використовували тварин, які пройшли карантинний режим та не мали зовнішніх проявів захворювань. Тварини утримувалися в спеціалізованому віварії біологічного факультету Запорізького національного університету, у стандартних пластмасових клітках при природному й додатковому штучному освітленні (з 8:00 до 17:00) при температурі 22-24°C. Тварини годувалися збалансованим комбікормом, мали вільний доступ до питної води та до їжі [245, 246]. Маніпуляції з тваринами проводилися з дотриманням регламентованих норм і правил поводження з лабораторними тваринами: принципів біоетики, законодавчих норм та вимог згідно з положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (м. Страсбург, Франція, 1986) [2, 247], Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» [248], Порядком проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах [249], Положення про Комітет з питань етики (біоетики) [250].

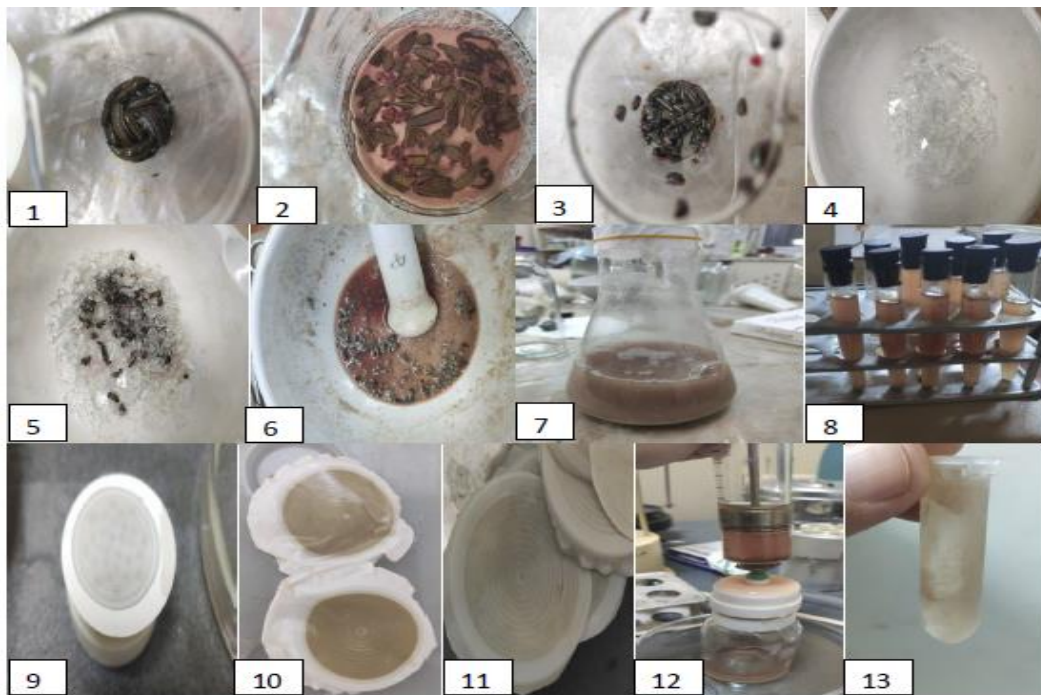
Тварин виводили з експерименту здвигом шийних хребців із подальшою декапітацією. Дослідження здійснювалися в один і той же час доби о 12 годині.

*Медичні п'явки.* В експерименті було задіяно 400 голодних товарних МП аптечного виду (*Hirudo verbana* Carena, 1820) віком 8-9 місяців, вирощених на базі навчально-науково-дослідної лабораторії клітинної та організменної біотехнології Запорізького національного університету (ТУ У 05.0-02125243-002:2009 «П'явка медична», санітарно-епідеміологічний висновок МОЗ України № 05.03.02-06/49982, від 12.08.2009 р.). У яких останнє годування кров'ю великої рогатої худоби (ВРХ) було 5 місяців тому. МП утримували в 3-х літрових ємкостях із дехлорованою відстояною водогінною водою об'ємом 2 л (по 10-15 осіб) при температурі оточуючого середовища +22-24°C [2, 251].

### **Методи дослідження**

#### ***Приготування водно-сольового екстракту з тіл медичної п'явки***

Для приготування витяжки із тіл медичних п'явок *H. verbana* (Carena, 1820) відбирали 25 особин вагою 0,9-1,2 гр., просушували фільтрувальним стерильним папером, фрагментували, розтирали у битому стерильному склі із фізіологічним розчином, екстрагували рис.2.1, фільтрували отриманий надосад через фільтри, промивали у фізіологічному розчині, просушували, розтирали та додавали до перетертої маси фізіологічний розчин у масовому співвідношенні 1:10, екстрагували суміш фізіологічним розчином у холодильнику, центрифугували та стерилізували надосад у стерильних міліпорових бакфільтрах. Після цього у суміщі визначали концентрацію білка за методом Лоурі [2, 252]. Отримані показники використовували для розрахунку оптимальної терапевтичної концентрації БАР *H. verbana* при тестуванні в культурі лейкоцитів.



**Рис. 2.1. Отримання комплексу БАР із тіл МП.** 1 - відбір МП, 2 – фрагментування МП, 3- просушування фільтрувальним папером МП, 4 – підготовка стерильного битого скла, 5 – внесення фрагментованих тіл МП у бите скло, 6 розтирання МП у битому склі із фізіологічним розчином, 7 - отримання суміші для наступного екстрагування, 8 – центрифугування суміші, 9 – підготовка пристрою для фільтрації, 10, 11 – фільтри різного діаметру порн, 12 – фільтрація, 13 – отримання кінцевого продукту (водно-сольового екстракту).

***Отримання оптимальної терапевтичної концентрації біологічно активних речовин in vitro***

Для проведення дослідження шляхом розведення екстракту фізіологічним розчином готували екстракти з різними концентраціями 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл. Для отримання терапевтичної концентрації здійснювалися дослідження *in vitro*. У дорослих статевозрілих нелінійних щурів масою 260 гр. після декапітації, брали стабілізовану гепарином кров у стерильну силіконову центрифужну пробірку, у цій крові досліджували загальну кількість лейкоцитів до інкубації. Після цього розливали кров у стерильні флакони з додаванням фізіологічного екстракту із тіл *H. verbana* (Carena, 1820) у перший флакон 1 мкг/мл, у другий 5 мкг/мл, у третій 50 мкг/мл, у четвертий 100 мкг/мл, а п'ятий був спонтанний без додавання екстракту у культуру крові, флакони закривали стерильними пробками та ставили на 2 год. в термостат. Після інкубування аналізували життєздатність клітин у



камері Горяєва із 0,2 % трипановим синім у об'ємному співвідношенні 1:1. Цей барвник не проникає через мембрани живих клітин, але при їх пошкодженні здатний забарвлювати клітинне ядро. Ті клітини, які були пофарбовані у голубий колір вважалися не життєздатними [253].

### ***Визначення гострої токсичності, тератогенної та ембріотоксичної дії речовини in vivo***

*Внутрішньочеревне введення.* Статевозрілим 7 місячним самицям та самцям щурів вводився внутрішньочеревно водно-сольовий екстракт МП в максимальній дозі 3500 мг/кг (VI клас токсичності, ЛД<sub>50</sub> > 3000 мг/кг), один раз відповідно до методичних рекомендацій.

*Внутрішлункове введення.* Статевозрілим 7 місячним самицям та самцям щурів внутрішньошлунково вводився водно-сольовий екстракт МП в максимальній дозі 5500 мг/кг (V клас токсичності, ЛД<sub>50</sub> > 5000 мг/кг) відповідно до методичних рекомендацій.

Спочатку на статевозрілих тваринах були визначені летальні токсичні дози – ЛД<sub>50</sub> (50%). За тваринама спостерігали на протязі 14 діб [254, 255].

Тератогенну та ембріотоксичну дію перевіряли на потомстві від самиць та самців, яким вводили максимальні концентрації екстракту. Реєстрували: вагітність за наявністю сперматозоїдів у вагінальному мазку, термін пологів, аномалії та смертність приплоду.

У тварин визначали вагу тіла, гематологічні показники крові (загальну кількість еритроцитів, загальну кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу крові, гемоглобін), фагоцитарну активність нейтрофілів, зовнішні зміни внутрішніх органів.

### ***Морфометричні методи аналізу тіла та основних лімфоїдних органів***

Для визначення морфометричних показників тіла тварин вимірювали вагу, довжину тіла та хвоста, окружність грудної клітки та живота. Вагу тварин вимірювали за допомогою аптечних вагів. Розміри тіла вимірювали за

допомогою штангенциркуля. Вагу лімфоїдних органів вимірювали за допомогою торсійних та аналітичних вагів [2].

### ***Підготовка зразків біологічного матеріалу***

*Отримання зразка крові для дослідження.* У лабораторних щурів кров отримували після здвигу шийних хребців із наступною декапітацією. Кров експериментальних тварин стабілізували гепарином (20 мкг/мл, «Спофа, Чехія») [2, 256].

*Отримання кісткового мозку у тварини.* Після декапітації швидко вилучали стегнові кістки тварин, очищали їх від прилеглих м'язів за допомогою стерильної марлі та анатомічного пінцету. Після отримання стегнової кістки, обрізали їх епіфізи і розрізали її по горизонтальній довжині, здавлюючи анатомічним пінцетом, вимивали та промивали теплим гіпотонічним 0,9 % цитратом натрію (37 °С), після чого видаляли кістку, а суміш переносили у центрифужні пробірки, використовуючи для цієї мети пастерівські піпетки. Шматочки кісткового мозку подрібнювали пікетуванням [2, 257-260].

*Отримання біоматеріалу лімфоїдних органів у тварин.* Після декапітації тварин робили розтин, забирали у них цілі лімфоїдні органи, які швидко піддавали фіксації у 10% формаліні [261].

### ***Гематологічні, біохімічні, імунологічні, цитологічні та гістологічні методи аналізу***

#### ***Оцінка лейкоцитарного складу крові***

Кількість лейкоцитів аналізували за стандартною методикою. Досліджувану венозну кров стабілізовану антикоагулянтом. В лунку серологічного планшета вносили 0,4 мл 5 % розчину оцтової кислоти, підфарбованою кількома краплями розчину метиленового синього (для фарбування ядер лейкоцитів), додавали 0,02 мл досліджуваної крові стабілізованою гепарином [2]. Суміш ретельно перемішували піпеткою та залишали на 1-2 хв. до повного лізису еритроцитів, після чого знову ретельно перемішували та заповнювали нею камеру Горяєва, залишали її в

горизонтальному положенні на 1 хв. для осідання лейкоцитів. Лейкоцити підраховували під мікроскопом у 100 великих квадратах камери Горяєва при малому збільшенні (окуляр К7×, об'єктив 20×).

Розрахунок кількості лейкоцитів проводили за формулою (2.1):

$$X=a \times 50, \quad (2.1)$$

де  $X$  — число лейкоцитів у 1 мкл крові;

$a$  — число лейкоцитів у 100 великих квадратах [257, 259].

Результат виражали у вигляді  $a \times 10^9/\text{л}$ .

Мазки крові для морфологічного дослідження готували за стандартною методикою [259]. Висушені на повітрі мазки крові фіксували метиловим спиртом протягом 5 хв., потім проводили експозицію 4 хв. у фосфатному буфері Соренсена з рН 6,8. Мазки крові фарбували протягом 35 хв. 10-15% розчином фарби Романовського-Гімзи, приготованої на буфері Соренсена з рН 6,8, після чого ще раз ополіскували у дистильованій воді, диференціювали у 0,01% розчині соляної кислоти на дистильованій воді, для видалення надлишку фарби, ополіскували у кількох порціях дистильованої води, висушували на повітрі та проводили визначення клітин під мікроскопом [2, 8, 262].

Дослідження пофарбованого мазка крові здійснювали під імерсійним об'єктивом (100×) мікроскопа. Лейкоцити диференціювали за відповідними морфологічними ознаками [258], рахували 200 лейкоцитів. Після завершення аналізу 200 лейкоцитів визначали лейкоцитарну формулу — абсолютне та відносне співвідношення різних видів лейкоцитів.

### ***Оцінка показників гемограми***

Кількість еритроцитів визначали за стандартною методикою. В суху чисту пробірку вносили 4 мл розчину хлориду натрію, куди вносили 0,02 мл гепаринізованої крові лабораторного щура. Вміст пробірки старанно змішували. Одну краплю приготованої суспензії вносили в щілину камери Горяєва, що утворилася між склом і камерою. Камеру залишали на 1 хв. Для осідання формених елементів. Еритроцити підраховували під мікроскопом

у 5 великих квадратах камери Горяєва по діагоналі ( $5 \times 16 = 80$  малих квадратів) при малому збільшенні (окуляр  $K7\times$ , об'єктив  $20\times$ ). Підрахунку підлягали еритроцити, що лежали в самому малому квадраті на лівій та верхній його межах. Результат отримували шляхом множення числа еритроцитів в 5 великих квадратах (80 малих) на  $10^{10}$ , при цьому результат виражали в кількості клітин на 1 л крові ( $\times 10^{12}/\text{л}$ ) [2, 258, 259].

Гемоглобін визначали за стандартною методикою. В пробірку вносили 5 мл заздалегідь виготовленого робочого розчину. В цю ж пробірку вносили 0,02 мл крові, суміш негайно перемішували. Через 10 хв. вимірювали оптичну густину проби проти робочого розчину при довжині хвилі 540-546 нм, кюветка 1 см. Концентрацію гемоглобіну розраховували за формулою: гемоглобін (г/л) =  $367,7 \times A_1$ , де  $A_1$  – екстинкція проби. При тих же умовах, як при вимірюванні проби, прямо в кюветку вливали вміст ампули з гемоглобіновим стандартом та вимірювали оптичну густину ( $A_2$ ). Концентрацію гемоглобіну розраховували за формулою: гемоглобін (г/л) =  $a \times A_1/A_2$ , де  $a$  – концентрація гемоглобіну в г/л в гемоглобіновому стандарті, який вказаний на етикетці ампули із набору; 251- розведення крові [2, 258-260].

### ***Дослідження оксидативного метаболізму нейтрофілів***

Оксидативний метаболізм нейтрофілів (ОМН) оцінювали в тесті з додаванням нітросинього тетразолію (НСТ) та додаванням дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*), як стимулятора. Постановку реакції ОМН проводили таким чином: готували суспензію дріжджів: брали ліофілізовані пекарські дріжджі, розводили з фізіологічним розчином у співвідношенні 1:5 і видержували на киплячій водяній бані впродовж 60 хв., отриману концентровану суспензію дріжджів центрифугували при 1500 об./хв. протягом 15 хв., відбирали надосад, до 0,1 мл осаду дріжджів додавали 10 мл фізіологічного розчину, отриману суміш ресуспендували. У щурів відбирали цільну кров, стабілізували її гепарином та наносили 50-100 мкл крові кожної тварини на органічну білковану підкладку предметного скла (оброблену 20 %

розчином пульованої плазми крові щурів), розподіляли НСТ-тест на спонтанний, в який додавали 0,1 % розчин НСТ у співвідношенні 1:1 і стимульований, в який крім НСТ додавали ще приготовану 1 % суспензію дріжджів у співвідношенні 1:1:1, ресуспендували суміш, інкубували суміш у вологій камері при температурі 38,7 °С, що відповідає нормальній температурі клітин крові тіла щура впродовж 65 хв. Після інкубації предметне скло обережно занурювали у порцію фосфатно-сольового розчину при рН 7,4, висушували його на повітрі при кімнатній температурі, фіксували протягом 15 хв. у метанолі, фарбували 1 % водним розчином сафраніну протягом 25 хв., промивали зразок у порції дистильованої води, диференціювали клітини у НСІ, промивали зразок у 2 порціях дистильованої води, досліджували у 100 клітинах кисеньактивовані нейтрофіли та визначали індекс стимуляції за співвідношенням навантажувального та спонтанного НСТ-тестів [263].

### ***Оцінка проліферативної активності лімфоцитів***

Проліферативну активність лімфоцитів оцінювали в цільній крові за реакцією бластної трансформації (РБТЛ) [2, 8, 258]. Постановку РБТЛ здійснювали наступним чином: брали цільну кров стабілізовану гепарином по 350 мкл та доводили до 2,5 мл живильним середовищем (50 мл середовища 199, 5 мл 10% ембріональної телячої сировотки, 15 мг глутаміну, 119 мг Нерес, 50мкг/мл гентаміцину, 0,05 Мм 2-меркаптоетанолу). Розливали суміш у пеніцилінові флакони, як позитивний контроль використовували показники проліферативної активності лімфоцитів, стимульованих конканаваліном А (Кона, Німеччина) в дозі 10 мкг/мл. Для дослідження впливу БАР МП на проліферативну активність лімфоцитів додавали у проби водно-сольовий екстракт з тіл *H. verbana* Carpa, 1820 у дозі 5 мкг/мл. Доза водно-сольового екстракту кільчеців була нами обрана за результатами попереднього тестування. Культивування проводили впродовж 24 год за температури 37°С. Через 24 год культивування зразки центрифугували (5 хв. при 1500 об./хв.), відбирали культуральний супернатант, а з осаду клітин готували цитологічні

препарати, фіксували метанолом, фарбували за Романовським-Гімзи із наступним диференціюванням у підкисленій соляною кислотою дистильованій воді, шляхом їх миттєвого занурення у відповідних розчинах. Проліферативну активність лімфоцитів оцінювали морфологічним методом із обліком 300 - 400 лімфоцитів, починаючи від початку «щіточки» до основи препарату. Активованими вважали: малі, середні та великі бласти. Лімфоцити з морфологічними ознаками апоптозу (цейозис плазмолемі, вакуолізація ядра і цитоплазми, каріорексис ядра та ін.) та некрозу (оксифільні плями) також відносили до активованих [2, 8].

### ***Визначення фагоцитарної активності нейтрофілів***

ФАН оцінювали в тесті з дріжджами (*Saccharomyces cerevisiae*) [2, 264]. Постановку реакції фагоцитозу проводили таким чином: наносили цільну кров, стабілізовану гепарином в обсязі 200 мкл на пробілковані предметні скельця, попередньо оброблені 20 % розчином пульмованої плазми крові, додавали до неї приготовану 1 % суспензію дріжджів у співвідношенні 1:1, старанно перемішували піпетуванням. Інкубували суміш у вологій камері в термостаті при температурі 37°C впродовж 90-95 хв. в умовах струшування, після інкубації предметні скельці обережно занурювали у 2 порції фосфатно-сольового розчину при рН 7,4, висушували їх на повітрі при кімнатній температурі, фіксували протягом 10-15 хв. у метанолі, фарбували предметні скельця 15 % розчином фарби Романовського-Гімзи протягом 40-45 хв., промивали зразки у порції дистильованої води, диференціювали клітини у НСІ; промивали зразки у 2 порціях дистильованої води. Підраховували 200 нейтрофілів за допомогою мікроскопу з використанням імерсійного об'єктиву (об'єктив 100×, окуляр К7×. Підраховували кількість фагоцитів із дріжджами та без них, також враховували кількість поглинутих дріжджів на 1 нейтрофіл. Вивчали наступні показники ФАН: ФІ — відсоток нейтрофілів, які беруть участь у фагоцитозі, від їх загальної кількості; фагоцитарне число (ФЧ) — середня кількість мікроорганізмів, яка була поглинута одним нейтрофілом [2, 264].

### ***Оцінка проліферативної активності кісткового мозку***

Проліферативну активність кісткового мозку оцінювали за мітотичним індексом (МІ). Кістковий мозок в 1 мл 0,9% цитрату натрію інкубували на водяній бані 10 хв. при 37°C, після інкубації клітини осаджували центрифугуванням упродовж 5 хв. при 1000 об./хв., відбирали надосад, до осаду додавали 3 мл фіксатору Корнуа (3 частини метилового спирту та 1 частина концентрованої уксусної кислоти), перемішували і ставили у холодильник на 20-30 хв., центрифугували та замінювали фіксатор, залишали на добу у холодильнику. Після цього готували цитологічні препарати, висушували їх та фарбували упродовж 40 хв. за Романовським-Гімзи. Аналізували 3000 клітин, визначали ті клітини, що знаходяться у мітозі. МІ виражали в проміле — кількості мітозів на 3000 клітин [2, 258, 259].

### ***Гістологічні методи аналізу***

Видалені лімфоїдні органи (селезінку та тимус) фіксували в 10% розчині формаліну у посуді з матового скла, зберігали при кімнатній температурі 2-3 доби до початку гістологічних дослідів. Далі селезінку та тимус за стандартною гістологічною методикою заливали в парафінові блоки, з яких виготовляли мікротомні серійні зрізи товщиною 6 мкм. Серійні зрізи робили з використанням мікротома Thermo Scientific HM 325 та фарбували гематоксилін-еозином за стандартною методикою [2, 261]. Аналізували гістологічні особливості білої пульпи селезінки – площу та діаметр лімфоїдних фолікулів (ЛФ), центральних артерій (ЦА) та кількість лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм<sup>2</sup>), у тимусі - кількість лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм<sup>2</sup>) в корковій та мозковій речовинах. Морфометричні та цитологічні дослідження проводили безпосередньо на гістологічних препаратах із використанням мікроскопу Carl Zeiss Primo Star. Мікрофотографії готували за допомогою мікроскопу PrimoStar iLED та фотокамери Axio CamERc5s («ZEISS», Німеччина), які були проаналізовані за допомогою програми для мікроскопії ZEISS ZEN 3.5 (blue edition) [2].

### ***Аналіз репродуктивної функції***

Репродуктивну функцію самців аналізували в такій послідовності: визначали вагу надсім'яників на торсійних та аналітичних вагах, потім їх розрізали вздовж та вимивали з них еякулят у 5 мл 5% розчину глюкози, зробленому на фізіологічному розчині, попередньо нагрітому до температури тіла тварини. В отриманій суспензії еякуляту рахували загальну кількість сперматозоїдів за допомогою камери Горяєва. Еякулят до визначення фертильності перебував у термостаті за температури 38°C. Визначення фертильності сперматозоїдів проводили в камері Горяєва (до фертильних відносили сперматозоїди, які в камері переміщувалися у просторі чи здійснювали рухи на одному місці). Морфологічні дослідження сперматозоїдів проводили на мазках, які робили з нерозведеного еякуляту, їх фіксували в 96% спирті та фарбували 15 % розчином Романовського-Гімзи 30 хв [265].

### **Статистична обробка даних**

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням параметричних статистичних методів (t-критерій Ст'юдента), попередньо перевіривши вибірки на нормальність розподілу, при цьому значення в таблицях представлені у вигляді  $X \pm SE$ , де  $X$  – вибіркове середнє,  $SE$  – стандартна помилка середнього, за допомогою пакету прикладних програм Microsoft XP «Exel» та IBM SPSS Statistics 21,0 (USA). Відмінності вважали достовірними при рівні значимості  $p < 0,05$ . Виявлення зв'язку між показниками оцінювали за результатами кореляційного аналізу; коефіцієнт кореляції Пірсона ( $r$ ) використовували для оцінки зв'язку між кількісними показниками [2, 8, 266-268].



### **РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ ВОДНО-СОЛЬОВОГО ЕКСТРАКТУ ІЗ МЕДИЧНИХ П'ЯВОК НА МОРФОМЕТРИЧНІ, МОРФОЛОГІЧНІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ ЩУРІВ**

Експериментальні дослідження цього розділу були присвячені визначенню гострої токсичності у статевозрілих нелінійних білих лабораторних щурів 7 місяців обох статей, тератогенної та ембріотоксичної дії у їхнього приплоду на введення водно-сольового екстракту із тіл МП виду *Hirudo verbana*, з подальшим дозованим його дослідженням впливу у передкоїтальному та після коїтальному періодах на кількісні та функціональні показники периферичної крові, проліферативну активність кісткового мозку (КМ), морфометричні параметри тіла, морфометричні, морфологічні та цитологічні показники лімфоїдних органів імунної системи лабораторних тварин статевозрілих самиць щурів та їх приплоду в динаміці постембріонального онотогенезу: на 1, 15, 30, 45 та 60 добу [2].

#### **Отримання *in vitro* оптимальної терапевтичної концентрації водно-сольового екстракту**

Для проведення дослідження шляхом розведення екстракту фізіологічним розчином готувався екстракт з різними концентраціями 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл. Для підтвердження дії імуномодулятора здійснювалися дослідження *in vitro*. У дорослих статевозрілих нелінійних білих щурів: 10 самиць та 10 самців, в середньому з ваго 250 гр. після декапітації, бралася стабілізована гепарином кров у стерильну силіконовану центрифужну пробірку, у цій крові досліджувалася загальна кількість лейкоцитів до інкубації. Після чого розливалася кров у стерильні флакони з додаванням водно-сольового екстракту із тіл *H. verbana* (Carena, 1820) у перший флакон 1 мкг/мл, у другий 5 мкг/мл, у третій 50 мкг/мл, у четвертий 100 мкг/мл, а п'ятий був спонтанний без додавання екстракту у культуру крові, флакони закривалися стерильними

пробками та ставилися на 2 години в термостат. Після інкубування аналізувалася життєздатність клітин у камері Горяєва із 0,2 % трипановим синім у об'ємному співвідношенні 1:1. Ті клітини, які були пофарбовані у голубий колір вважалися не життєздатними. При аналізі життєздатності клітин були отримані: терапевтична доза 5 мкг/мл, у якій відсоток живих клітин майже не відрізнявся від контролю та цитотоксичні дози ЛД<sub>50</sub> 50 мкг/мл (50 % життєздатність клітин) та ЛД<sub>100</sub> 100 мкг/мл (практично всі клітини не життєздатні), а концентрація 1 мкг/мл майже не відрізнялася від терапевтичної, але при використанні її треба значно частіше вводити екстракт для досягнення ефекту [253]. Терапевтична концентрація використовувалася в наступних дослідженнях.

### **Визначення гострої токсичності, тератогенної та ембріотоксичної дії водно-сольового екстракту**

Визначення гострої токсичності перевіряли двома методами введення: внутрішньочеревно та внутрішньошлунково.

Перша група 10 самиць та 10 самців статевозрілих 7 місячних лабораторних білих нелінійних щурів, яким вводився внутрішньочеревно водно-сольовий екстракт МП в максимальній дозі 3500 мг/кг (VI клас токсичності, ЛД<sub>50</sub> > 3000 мг/кг), один раз відповідно до методичних рекомендацій. Також, було проаналізовано їхній приплід при народженні у кількості 50 особин.

Друга група 10 самиць та 10 самців статевозрілих 7 місячних лабораторних білих нелінійних щурів, яким внутрішньошлунково вводився водно-сольовий екстракт МП в максимальній дозі 5500 мг/кг (V клас токсичності, ЛД<sub>50</sub> > 5000 мг/кг) відповідно до методичних рекомендацій. Також, було проаналізовано їхній приплід при народженні у кількості 50 особин.

Спочатку у статевозрілих тваринах визначалася токсична доза – ЛД<sub>50</sub> (50 %) відповідно до методичних рекомендацій. За тваринама велися спостереження на протязі 14 діб. Тератогенність та ембріотоксичність

перевірялася на потомстві від самиць та самців, яким вводилися максимальні концентрації екстракту внутрішньочеревно та внутрішньошлунково. Вагітність перевірялася наявністю сперматозоїдів у вагінальному мазку. Відмічалися термін пологів, аномалії та смертність приплоду, цим самим визначалася ембріотоксична та тератогенна дії. При аналізі тварин при внутрішньочеревному та внутрішшлунковому введенні максимальних доз водно-сольового екстракту, не відбувалося загибелі тварин, вони були охайними, мали задовільний апетит, нормально реагували на звукові та світлові подразники, процеси сечовиділення та дефекації були у нормі, порушення дихання та судом не відмічалось. Вага тварини відповідала фізіологічним нормам даного віку. При аналізі гематологічних показників: загальна кількість еритроцитів, загальна кількість лейкоцитів, гемоглобін, лейкоцитарна формула крові, фагоцитана активність нейтрофілів були в межах фізіологічних норм даного віку. При розтині тварин зовнішньо їхні внутрішні органи без змін [254, 255]. Тіж результати були отримані при аналізі їхнього приплоду при народженні. Незмінність показників при введенні максимальних доз внутрішньочеревно та внутрішньошлунково може свідчити про відсутність токсичної дії водно-сольового екстракту, та характеризувати його як практично нетоксичний, але для подальшого уникнення можливої ембріотоксичної та тератогенної дії у приплоду при прямій дії водно-сольового екстракту в наступних дослідках була взята за терапевтичну концентрація БАР МП, яка була розрахована *in vitro* у культурі клітин.

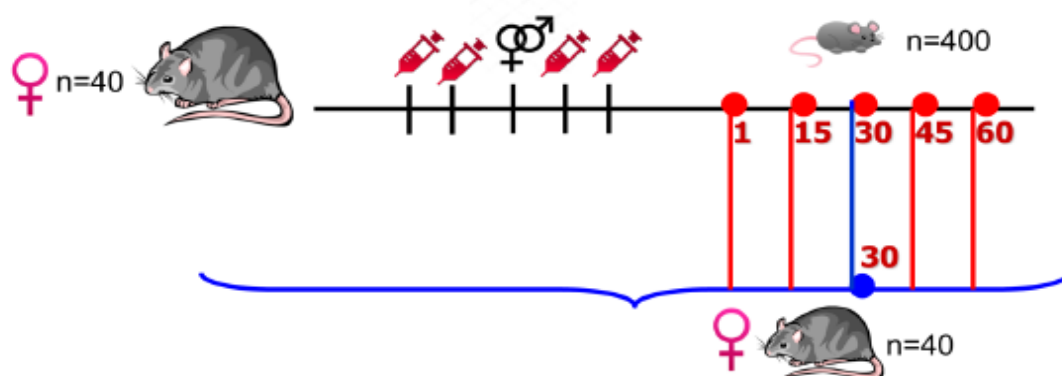
### **Схеми подальших експериментальних досліджень**

В експеримент було взято 40 лабораторних нелінійних білих щурів-самиць та їхнього приплоду (n=400) в динаміці: на 1, 15, 30, 45 та 60 добу [2]. Тварини були розподілені з використанням принципу рандомізації на 2 групи, кожна з яких містила по 20 щурів-самиць рис. 3.1:

1) контрольна група щурів-самиць, яким шляхом короткочасного фіксування, внутрішньочеревно один раз на тиждень вводився фізіологічний розчин у кількості 0,5 мл, за наступною схемою: двічі до спарювання (передкоїтальний період) та двічі – після спарювання (після коїтальний період).

2) дослідна група щурів-самиць, шляхом короткочасного фіксування, внутрішньочеревно вводився водно-сольовий екстракт МП, 4 рази, один раз на тиждень в об'ємі 0,5 мл із кінцевою концентрацією речовини 5 мкг/г тварини, за наступною схемою: двічі до спарювання та двічі – після спарювання, після чого досліджувалися показники імунної системи після вигодовування та відсадки від них їхнього приплоду. Приплід на фоні впливу водно-сольового екстракту БАР МП та контрольної групи досліджувався: на 1, 15, 30, 45 та 60 добу. Тварин виводили з експерименту шляхом дислокації шийних хребців з наступною декапітацією [2].

Для спарювання двох груп було взято 40 нелінійних білих щурів-самців.



#### Дослідження:

- вагових показників тіла;
- вагових показників та цитоморфологічних характеристик лімфоїдних органів;
- мітотичного індексу кісткового мозку;
- гематологічних показників;
- фагоцитарної активності нейтрофілів;
- оксидативного метаболізму нейтрофілів;
- проліферативної активності лімфоцитів.

- часова точка збору біологічного матеріалу у самиць
- часові точки збору біологічного матеріалу у приплоду
- 🪡 введення водно-сольового екстракту медичної п'явки

Рис. 3.1. Схема проведених експериментальних досліджень

## **Гематологічні, морфометричні показники тіла та лімфоїдних органів самиць та їхнього приплоду**

З літературних даних відомо, що при всіх експериментально доклінічних та клінічних дослідженнях, щодо стану внутрішнього організму обов'язково в першу чергу аналізують гематологічні та лейкоцитарні показники крові, які відображають гомеостатичний стан всього організму на момент його обстеження. Вагові та лінійні показники тіла, теж характеризують фізіологічні особливості нормального розвитку. Дослідження кількісних та функціональних показників крові, в комплексі з обстеженням морфологічних параметрів тіла тварини, дозволяє виявити приховані патологічні зміни в клітинах, тканинах і органах, визначити їх ускладнення, підвищити правильність диференціювання захворювання, оцінити функціональний стан окремих органів та систем, контролювати ефективність лікувальних та профілактичних заходів, прогнозувати результат захворювання [2]. Кров, як одна із біологічних рідин організму, яка реагує якісними і кількісними змінами свого складу на будь-які екзогенні та ендогенні чинники, що робить її своєрідним біомаркером, який дозволяє визначити загальний стан органів та систем, оцінити перебіг основних обмінних процесів. Саме тому дослідження кількісних та функціональних показників крові, в комплексі з обстеженням фізичних параметрів тіла тварини дозволяє встановити перехід від фізіологічного стану організму до патологічного, зокрема і за дії на нього екзогенних факторів [2].

У дослідних статевозрілих самиць, які були виведені з експерименту здвигом шийних хребців після вигодовування та відсадки від них їхнього приплоду, відзначалися односпрямовані позитивні зміни у всіх морфометричних показниках тіла та лімфоїдних органах, в порівнянні з контрольною групою тварин табл. 3.1 та табл. 3.2. Однак, ці односпрямовані збільшення були нерівномірними [2, 269]. У самиць, яким вводився водно-сольовий екстракт у передкоїтальному та після коїтальному періодах, відзначалася тенденція до збільшення ваги тіла (на 7,41%) (табл. 3.1). Таку ж

динаміку змін на фоні впливу БАР МП водно-сольового екстракту було зареєстровано у їхнього приплоду на 1, 15, 30, 45 та 60 добу постембріонального онтогенезу. Починаючи з першої доби відмічалася тенденція до збільшення усіх морфометричних показників тіла (табл.3.1). На 15 добу збільшувалася вага тіла (на 13,08%) та окружність грудної клітки (ОГ) (на 9,99%) у порівнянні з контрольною групою тварин. На 30 добу, коли завершувалося формування тіла щурів, збільшувалася їхня вага тіла (на 26,75%), довжина хвоста (на 16,04%), ОГ (на 7,42%) та окружність живота (ОЖ) (на 11,35%) [2, 269].

При аналізі лімфоїдних органів імунної системи, у дослідних статевозрілих самиць відмічалася достовірне збільшення усіх їх морфометричних показників порівняно з контрольною групою тварин (табл. 3.2 та 3.3).

У їхнього приплоду, також супроводжувалося позитивне збільшення показників даних органів (табл. 3.2 та 3.3). Так, під впливом БАР МП у дослідної групи тварин на першу добу достовірно збільшувалася вага тимусу у порівнянні з контрольною групою. На 15 добу відмічався приріст довжини (на 9,78%) та ширини (на 10,97%) тимусу, ваги (на 7,98%) селезінки. На 30 добу відбувався приріст ваги (на 17,97%) та ширини (на 13,29%) тимусу  $p < 0,05$ . На 60 добу статистично значимий приріст ширини (на 13,05%) селезінки [2, 269].

У дослідних групах самиць щурів лейкоцитарна формула крові залишалася в межах референтних значень (табл.3.3) [269]. Підвищувалися показники загальної кількості еритроцитів (на 6,25%) та вмісту гемоглобіну (на 23,56%) (табл.3.3) у порівнянні з контрольними групами тварин. Кольоровий показник залишався в референтних значеннях (табл.3.3). Позитивні зміни у лімфоїдних органах самиць та приплоду сприяли підвищенню їхніх гематологічних показників: лейкоцитів та еритроцитів у крові дослідної групи щурів (табл.3.3). Так статистично значуще підвищення загальної кількості лейкоцитів відбувалося у самиць (на 41,02%) та їхнього приплоду на 15 (на 26,67%) та 60 (на 37,5%) добу  $p < 0,05$  [2].

**Таблиця 3.1. Морфометричні параметри тіла самиць та їхнього приплоду за впливу водно-сольового екстракту**

Параметри тіла						
Група тварин		Вага тіла (г)	Довжина тіла (см)	Довжина хвоста (см)	Окружність грудної клітки (см)	Окружність живота (см)
Самиці	Контроль	201,20±8,41	19,21±0,40	16,75 ± 0,31	15,10± 0,31	15,40 ± 0,41
	Вплив водно-сольового екстракту	217,31±9,30	19,70±0,41	17,30±0,20*	14,71 ± 0,20	16,31±0,40*
Приплід						
1- доба	Контроль	6,23 ±0,25	5,01 ± 0,21	1,70 ± 0,07	4,43 ± 0,18	4,75 ± 0,19
	Вплив водно-сольового екстракту	6,30 ±0,25	5,16±0,20	1,78 ± 0,07	4,46 ± 0,18	4,75 ± 0,19
15- доба	Контроль	20,60 ± 0,81	8,35 ± 0,30	4,90 ± 0,21	6,76 ± 0,27	7,15 ± 0,29
	Вплив водно-сольового екстракту	23,70±0,95*	8,51±0,34	4,63 ± 0,18	7,51 ± 0,30*	7,70 ± 0,31
30 - доба	Контроль	57,51 ± 2,30	13,00±0,51	8,90 ± 0,36	8,48 ± 0,34	9,84 ± 0,39
	Вплив водно-сольового екстракту	78,50±3,14*	13,50±0,54	10,61±0,42*	9,16 ± 0,37*	11,00±0,44*
45 - доба	Контроль	88,70± 3,55	14,90±0,60	13,30±0,53	9,50±0,42	11,91±0,48
	Вплив водно-сольового екстракту	85,81±3,41	15,10±0,61	13,11±0,51	10,31±0,41	11,20±0,44
60 - доба	Контроль	143,01±5,71	16,00±0,71	14,00 ± 0,57	12,01 ± 0,48	14,21 ± 0,57
	Вплив водно-сольового екстракту	153,00±6,11	16,51±0,70	12,71±0,50*	11,30 ± 0,45	14,20 ± 0,57

Примітка: \* -  $p < 0,05$  порівняно із контрольною групою [2, 269].

Загальна кількість еритроцитів у приплоді дослідної групи збільшувалася у всіх термінах спостереження, статистично значимого зсуву рівня було відзначено на 15 (на 35%) та 30 (на 26,31%) добу  $p < 0,05$  (табл.3.4).

**Таблиця 3.2. Морфометричні показники центрального лімфійного органу самиць та їхнього приплоду за впливу водно-сольового екстракту**

Група тварин		Морфометричні показники тимусу		
		Вага (мг)	Довжина (см)	Ширина (см)
Самиці	Контроль	268,41 ± 11,41	1,45 ± 0,03	1,21 ± 0,03
	Вплив водно-сольового екстракту	345,11±17,01*	1,64 ± 0,09*	1,52 ± 0,08*
Приплід				
1 - доба	Контроль	15,50 ± 0,61	0,47 ± 0,02	0,35 ± 0,01
	Вплив водно-сольового екстракту	17,21 ± 0,69*	0,44 ± 0,02	0,33 ± 0,01
15 - доба	Контроль	88,60 ± 3,5	0,83 ± 0,03	0,73 ± 0,03
	Вплив водно-сольового екстракту	85,61 ± 3,3	0,92 ± 0,04*	0,82 ± 0,03*
30 - доба	Контроль	251,01 ± 10,11	1,44 ± 0,06	1,24 ± 0,05
	Вплив водно-сольового екстракту	306,00± 12,00*	1,41 ± 0,06	1,43 ± 0,06*
45 - доба	Контроль	266,01±10,61	1,50±0,06	1,25±0,05
	Вплив водно-сольового екстракту	254,02±9,00	1,51±0,06	1,30±0,05
60 - доба	Контроль	460,00± 18,41	1,77 ± 0,07	1,63 ± 0,06
	Вплив водно-сольового екстракту	447,11± 16,30	1,61 ± 0,06*	1,80 ± 0,07*

Примітка: \* -  $p < 0,05$  порівняно із контрольною групою [2, 269].

Паралельно з кількістю еритроцитів підвищується рівень гемоглобіну з достовірним значущим відхиленням на першу (на 30,91%) та 60 (на 9,69%) добу  $p < 0,05$ , у порівнянні з контрольною групою тварин (табл.3.4). Кольоровий показник залишався в межах референтних значень табл.3.3 [2, 269].



**Таблиця 3.3. Морфометричні показники периферичного лімфоїдного органу самиць та їхнього приплоду за впливу водно-сольового екстракту**

Група тварин		Морфометричні показники селезінки		
		Вага (мг)	Довжина (см)	Ширина (см)
Самиці	Контроль	465,03 ± 23,33	3,21 ± 0,09	0,71 ± 0,03
	Вплив водно-сольового екстракту	566,11 ± 53,40*	3,58 ± 0,09*	0,91 ± 0,04*
Приплід				
1 - доба	Контроль	22,00 ± 0,91	1,32 ± 0,05	0,22 ± 0,01
	Вплив водно-сольового екстракту	21,01 ± 0,84	1,10 ± 0,04*	0,72 ± 0,03*
15 - доба	Контроль	72,61 ± 2,90	1,60 ± 0,06	0,36 ± 0,01
	Вплив водно-сольового екстракту	78,90 ± 3,01*	1,68 ± 0,06	0,30 ± 0,01
30 - доба	Контроль	140,01 ± 5,60	2,14 ± 0,08	0,48 ± 0,02
	Вплив водно-сольового екстракту	239,00 ± 9,51*	2,13 ± 0,08	0,67 ± 0,03*
45 - доба	Контроль	253,02 ± 10,10	2,35 ± 0,10	0,62 ± 0,03
	Вплив водно-сольового екстракту	273,00 ± 10,91	2,63 ± 0,11*	0,63 ± 0,02
60 - доба	Контроль	522,00 ± 20,91	3,13 ± 0,12	0,81 ± 0,03
	Вплив водно-сольового екстракту	549,01 ± 22,01	3,60 ± 0,11*	0,77 ± 0,03

Примітка: \* -  $p < 0,05$  порівняно із контрольною групою [2, 269].

При аналізі відносного співвідношення популяцій лейкоцитів у лейкоцитарній формулі крові дослідної групи тварин, не спостерігався вплив БАР МП на гомеостатичну диференціювання лейкоцитів в мієлопоезі та лімфопоезі (табл. 3.5). Разом із тим абсолютні значення співвідношення популяцій лейкоцитів у дослідної групи самиць значно збільшувалися, і як наслідок відбувалося збільшення їх загальної кількості під впливом стимуляції МІ КМ.

**Таблиця 3.4. Загальна кількість лейкоцитів та еритроцитів, гемоглобін, кольоровий показник самиць та їхнього приплоду за впливу водно-сольового екстракту**

Група тварин		Показники			
		лейкоцити/л ( $\times 10^9$ )	еритроцити/л ( $\times 10^{12}$ )	гемоглобін, г/л	кольоровий показник
Самиці	Контроль	6,83 $\pm$ 0,13	5,97 $\pm$ 0,14	145,95 $\pm$ 2,16	0,74 $\pm$ 0,03
	Вплив водно-сольового екстракту	11,90 $\pm$ 0,37	6,13 $\pm$ 0,25	199,99 $\pm$ 8,37	0,91 $\pm$ 0,08
Приплід					
1 - доба	Контроль	8,02 $\pm$ 0,54	1,75 $\pm$ 0,19	76,45 $\pm$ 3,46	1,98 $\pm$ 0,19
	Вплив водно-сольового екстракту	8,86 $\pm$ 0,36	2,09 $\pm$ 0,06	107,14 $\pm$ 2,56	1,72 $\pm$ 0,28
15 - доба	Контроль	4,40 $\pm$ 0,26	1,27 $\pm$ 0,03	80,20 $\pm$ 0,79	2,04 $\pm$ 0,26
	Вплив водно-сольового екстракту	6,06 $\pm$ 0,35 *	1,94 $\pm$ 0,22*	106,7 $\pm$ 1,62	0,97 $\pm$ 0,19
30 - доба	Контроль	5,02 $\pm$ 0,18	2,70 $\pm$ 0,11	103,46 $\pm$ 2,06	1,21 $\pm$ 0,14
	Вплив водно-сольового екстракту	4,64 $\pm$ 0,07	3,80 $\pm$ 0,27*	109,04 $\pm$ 5,51	0,98 $\pm$ 0,17
45 - доба	Контроль	6,07 $\pm$ 0,15	2,62 $\pm$ 0,14	139,92 $\pm$ 5,86	1,54 $\pm$ 0,9
	Вплив водно-сольового екстракту	6,54 $\pm$ 0,16*	4,02 $\pm$ 0,29*	137,08 $\pm$ 2,54	1,11 $\pm$ 0,36
60 - доба	Контроль	5,50 $\pm$ 0,16	4,26 $\pm$ 0,16	135,00 $\pm$ 3,47	0,95 $\pm$ 0,09
	Вплив водно-сольового екстракту	7,20 $\pm$ 0,53*	5,20 $\pm$ 0,07	148,43 $\pm$ 2,70*	0,86 $\pm$ 0,07

Примітка: \* -  $p < 0,05$  порівняно із контрольною групою [2].

Однак, слід зазначити вплив БАР МП на зміни диференціювання популяцій лейкоцитів у приплоді дослідної групи самиць. Так, на першу добу у тварин відбувалося зниження клітин вродженого імунітету (гранулоцитів та моноцитів), за рахунок збільшення клітин адаптивного імунітету (лімфоцитів), що свідчило про прискорену диференційовку лімфоїдної системи у напрямок дорослих тварин, за рахунок дії БАР МП [2].

Таблиця 3.5. Лейкоцитарна формула крові самиць та їхнього приплоду за впливу водно-солевого екстракту

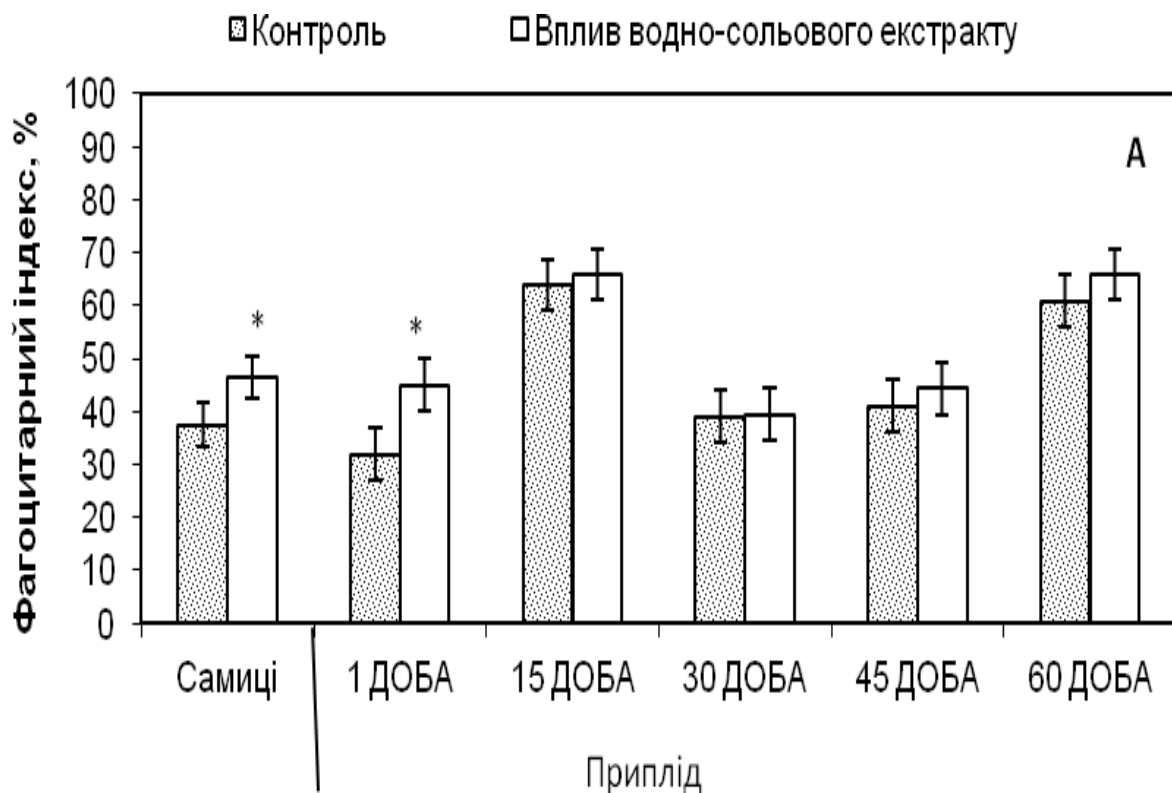
Група тварин		Лейкоцитарна формула крові % / кл. × 10 <sup>9</sup>						Лімфоцити	Моноцити
		Еозинофіли		Нейтрофіли		Загальний відсоток			
		Паличкоядерні	Сегментоядерні	Сегментоядерні	Загальний відсоток				
Самиці	Контроль	<u>0,45 ± 0,07</u> 0,03 ± 0,001	<u>7,70 ± 1,25</u> 0,52 ± 0,03	<u>18,70 ± 1,99</u> 1,28 ± 0,06	<u>26,40 ± 2,40</u> 1,80 ± 0,09	<u>70,80 ± 0,99</u> 4,90 ± 0,24	<u>2,35 ± 0,52</u> 0,09 ± 0,005		
	Вплив водно-солевого екстракту	<u>0,40 ± 0,06</u> 0,05 ± 0,002	<u>6,00 ± 0,80</u> 0,71 ± 0,03*	<u>17,70 ± 1,22</u> 2,11 ± 0,10*	<u>23,70 ± 2,25</u> 2,82 ± 0,14*	<u>72,10 ± 1,01</u> 8,58 ± 0,43*	<u>3,80 ± 0,66*</u> 0,45 ± 0,02*		
Приплід									
1 - доба	Контроль	<u>0,52 ± 0,07</u> 0,04 ± 0,002	<u>33,67 ± 1,39</u> 2,70 ± 0,13	<u>15,33 ± 2,14</u> 1,23 ± 0,06	<u>49,00 ± 2,98</u> 3,93 ± 0,20	<u>45,15 ± 1,93</u> 3,62 ± 0,18	<u>5,33 ± 0,63</u> 0,43 ± 0,02		
	Вплив водно-солевого екстракту	<u>0,64 ± 0,08</u> 0,03 ± 0,002	<u>21,67 ± 3,02 *</u> 1,92 ± 0,09*	<u>16,05 ± 0,36</u> 1,42 ± 0,07*	<u>37,72 ± 2,01 *</u> 3,32 ± 0,17*	<u>59,38 ± 2,1 *</u> 5,26 ± 0,26*	<u>2,26 ± 0,44*</u> 0,20 ± 0,01*		
15 - доба	Контроль	<u>0,21 ± 0,04</u> 0,009 ± 0,0004	<u>3,80 ± 0,67</u> 0,17 ± 0,008	<u>9,40 ± 1,14</u> 0,41 ± 0,02	<u>13,20 ± 3,38</u> 0,58 ± 0,03	<u>83,21 ± 0,94</u> 3,66 ± 0,18	<u>3,40 ± 0,49</u> 0,15 ± 0,007		
	Вплив водно-солевого екстракту	<u>0,12 ± 0,02</u> 0,007 ± 0,0004	<u>6,25 ± 1,21</u> 0,38 ± 0,02*	<u>13,75 ± 1,49 *</u> 0,83 ± 0,04*	<u>20,00 ± 3,19*</u> 1,21 ± 0,06*	<u>77,38 ± 0,78*</u> 4,69 ± 0,23*	<u>2,5 ± 0,34</u> 0,15 ± 0,007		
30 - доба	Контроль	<u>0,41 ± 0,05</u> 0,02 ± 0,001	<u>3,00 ± 0,34</u> 0,15 ± 0,007	<u>2,65 ± 0,11</u> 0,13 ± 0,007	<u>5,65 ± 2,42</u> 0,28 ± 0,01	<u>88,95 ± 0,50</u> 4,46 ± 0,22	<u>4,99 ± 0,22</u> 0,25 ± 0,01		
	Вплив водно-солевого екстракту	<u>0,50 ± 0,07</u> 0,023 ± 0,001	<u>7,72 ± 1,85 *</u> 0,36 ± 0,002*	<u>6,75 ± 0,61</u> 0,31 ± 0,01*	<u>14,47 ± 3,57*</u> 0,67 ± 0,03*	<u>79,78 ± 1,47</u> 3,70 ± 0,18*	<u>5,25 ± 0,50</u> 0,24 ± 0,01		
45 - доба	Контроль	<u>0,2 ± 0,09</u> 0,012 ± 0,0006	<u>2,05 ± 0,45</u> 0,12 ± 0,006	<u>6,05 ± 0,71</u> 0,37 ± 0,02	<u>8,10 ± 1,22</u> 0,49 ± 0,02	<u>89,35 ± 1,07</u> 5,42 ± 0,27	<u>2,35 ± 0,56</u> 0,14 ± 0,007		
	Вплив водно-солевого екстракту	<u>0,3 ± 0,1</u> 0,02 ± 0,001	<u>3,15 ± 0,66</u> 0,21 ± 0,01*	<u>7,75 ± 1,21</u> 0,51 ± 0,02*	<u>10,90 ± 3,25*</u> 0,72 ± 0,04*	<u>84,45 ± 1,74*</u> 5,52 ± 0,28	<u>3,75 ± 0,41*</u> 0,24 ± 0,01*		
60 - доба	Контроль	<u>0,81 ± 0,11</u> 0,04 ± 0,002	<u>4,82 ± 0,95</u> 0,22 ± 0,01	<u>5,76 ± 0,60</u> 0,26 ± 0,01	<u>10,58 ± 3,04</u> 0,48 ± 0,02	<u>86,76 ± 1,62</u> 3,90 ± 0,19	<u>2,65 ± 0,12</u> 0,12 ± 0,006		
	Вплив водно-солевого екстракту	<u>0,88 ± 0,17</u> 0,06 ± 0,003	<u>12,88 ± 1,86 *</u> 0,93 ± 0,05*	<u>8,17 ± 1,51</u> 0,59 ± 0,03*	<u>21,05 ± 3,11*</u> 1,52 ± 0,08*	<u>74,01 ± 1,80</u> 5,33 ± 0,27*	<u>4,06 ± 0,59</u> 0,29 ± 0,01*		

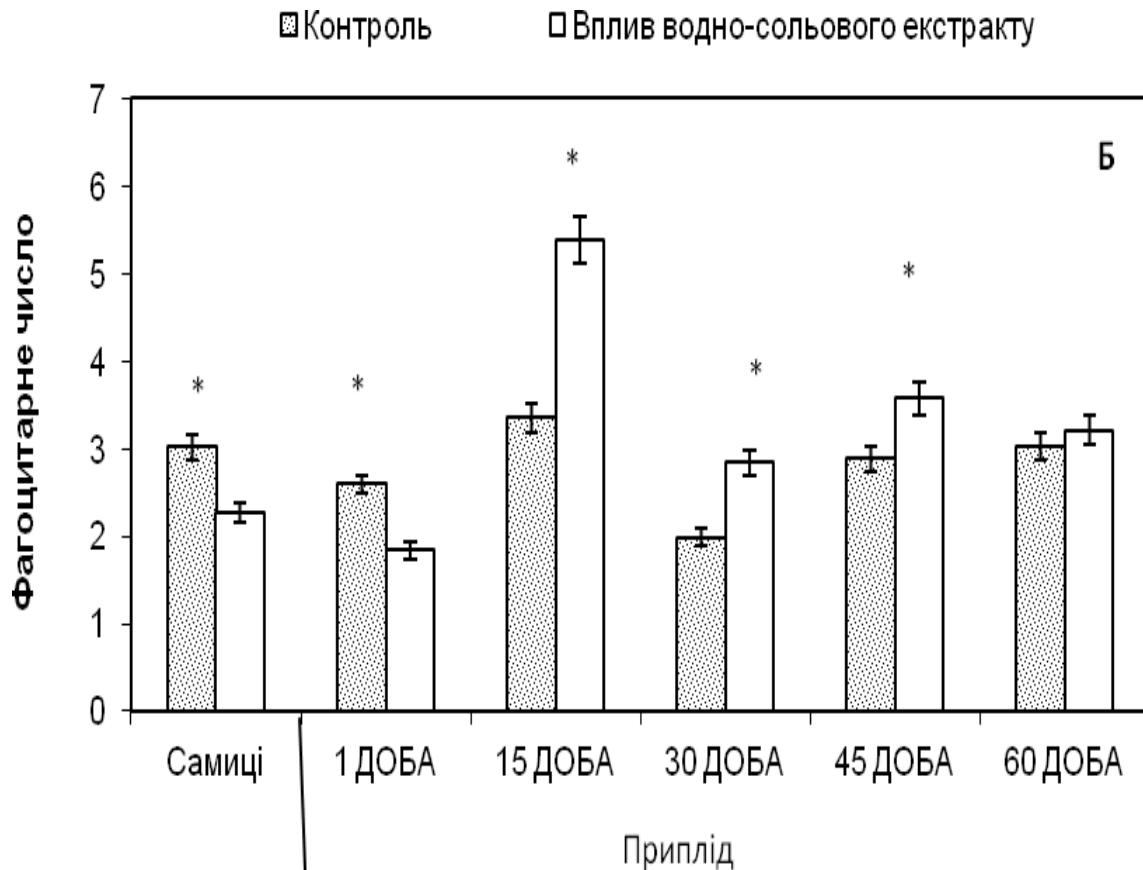
Примітка: \* -  $p < 0,05$  порівняно із контрольною групою; %- відносне значення, кл. × 10<sup>9</sup> – абсолютне значення [2].

Деякі відмінності диференціювання лейкоцитів також відбувалися на 30 та 60 добу. На цих термінах відбувався нейтрофільозний зсув вліво, за рахунок напруги вродженої ланки імунітету при наявності адекватної кількості клітин адаптивного імунітету. Таким, чином в період підвищеної напруги морфогенезу у дослідної групи тварин активувалася, як вроджена, так і адаптивна ланки імунної системи [2, 269].

### Поглиняльна активність та оксидативний метаболізм нейтрофілів крові самиць та їхнього приплоду

При аналізі поглинаючої активності нейтрофілів, у тварин під впливом водно-сольового екстракту МП відмічалось збільшення ФІ у всіх термінах дослідження [2, 270], статистично значиме на 1 добу (на 28,89%) та у самиць (на 19,35%)  $p < 0,05$  (рис. 3.2, А). ФЧ значимо збільшувалося на 15 (на 37,85%), 30 (на 30,28%) та 45 (на 19,37%) добу  $p < 0,05$  (рис. 3.2, Б).





**Рис. 3.2.** Фагоцитарна активність нейтрофілів крові самиць та їхнього приплоду за впливу водно-сольового екстракту. А – фагоцитарний індекс, Б – фагоцитарне число.

Примітка: \* -  $p < 0,05$  порівняно із контрольною групою [2].

Аналізуючи ОМН у самиць щурів та їхнього приплоду під впливом водно-сольового екстракту МП, НСТ спонтанний тест значимо збільшувався у самиць (на 41,02%) та їхнього приплоду на всіх термінах дослідження [2, 270]: на 15 (на 23,15%), 30 (на 21,35%), 45 (на 30,84%) та 60 (на 40,05%) добу порівняно з контрольною групою тварин (рис. 3.3, А). Також, тенденція до збільшення зареєстрована при дослідженні НСТ стимульованого тесту, у самиць (на 42,98%) та їхнього приплоду на 15 (на 21,83%), 30 (на 20,27%), 45 (на 20,00%) та 60 (на 21,57%) добу (рис. 3.3, Б) [2, 270].

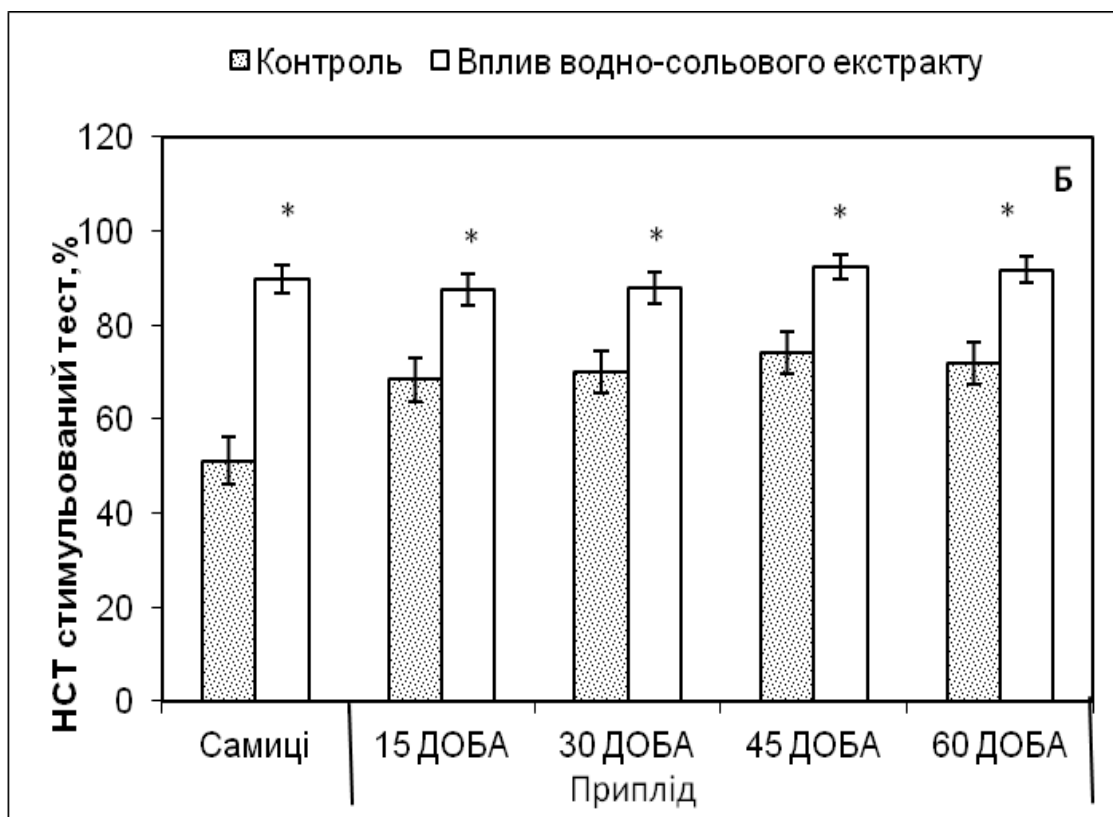
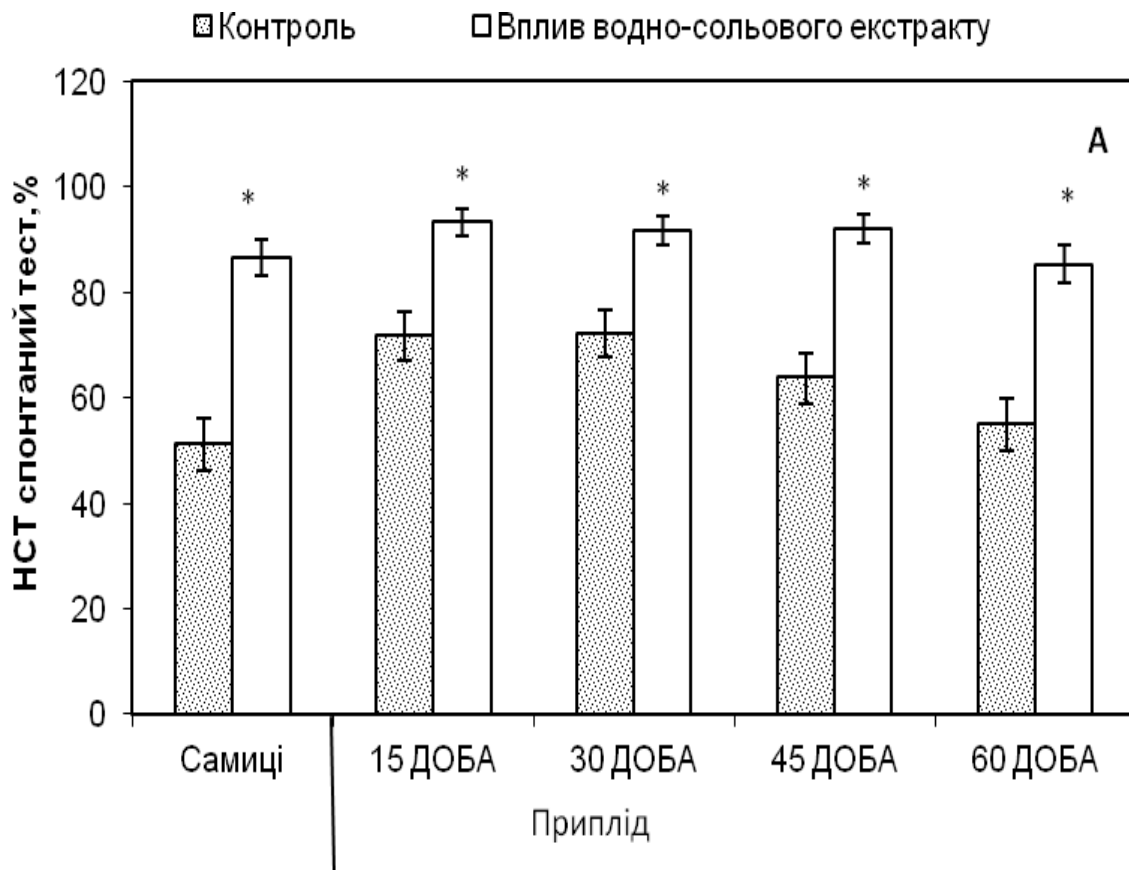


Рис. 3.3. Оксидативний метаболізм нейтрофілів крові самиць та їхнього припліду за впливу водно-сольового екстракту. А – НСТ спонтаний, Б – НСТ стимульований [2].

Примітка: \* -  $p < 0,05$  порівняно із контрольною групою.

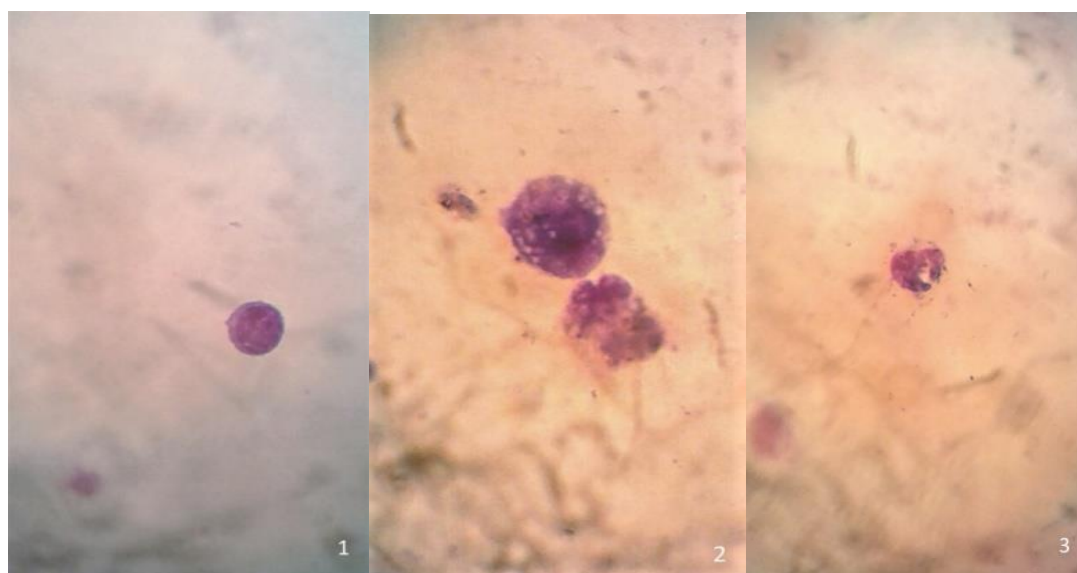
## Проліферативна активність лімфоцитів крові самиць та їхнього приплоду

У статевозрілих самиць шурів при аналізі РБТЛ у контрольної та дослідної груп тварин, при стимуляції рослинним мітогеном та БАР МП збільшувався відсоток бластних клітин (табл.3.6) [2, 271]. Так, у контрольної групи на стимуляцію КонА на 61,27%, БАР МП на 37,33%, а у дослідної групи на стимуляції КонА на 62,60% та БАР МП на 64,28 %, порівняно зі спонтанними культурами. Таку ж тенденцію до збільшення відсотка на стимуляцію КонА та БАР МП було виявлено і у їхнього приплоду на всіх етапах онтогенезу. У дослідної групи статевозрілих самиць та у їхнього приплоду порівняно з контрольною групою, у всіх культурах крові значно збільшувалися бластнотрансформовані лімфоцити ( $p < 0,05$ ). Збільшена реакція лімфоцитів на БАР МП *Hirudo verbana* може вказувати на їх поліклональну активацію, як і на рослинний лектин. У статевозрілих самиць РБТЛ на БАР МП, як у контрольній групі, так і у дослідній значно перевищували спонтанні ( $p < 0,05$ ). Також, динаміка відмічалася і у їхнього приплоду. РБТЛ на БАР МП наближалася до показників рослинного лектину КонА. Бласти морфологічно відрізнялися. Стимульовані рослинним лектином були типовими, що може свідчити про продуктивний лімфогенез. При стимуляції БАР МП бласти мали недостатньо розвинену цитоплазму та знижену її базофільність, що може свідчити про недостатній розвиток білок-синтетичної системи. У культурах із БАР МП деякі стимульовані лімфоцити мали признаки апоптозу: цитопікноз, каріопікноз, вакуолізація ядра та цитоплазми (рис. 3.4). В таких культурах також зустрічалися некротичні лімфоцити у вигляді дифузних еозинофільних плям. Апоптоз та некроз лімфоцитів може свідчити про протизапальну дію БАР МП (рис. 3.4) [2, 271].

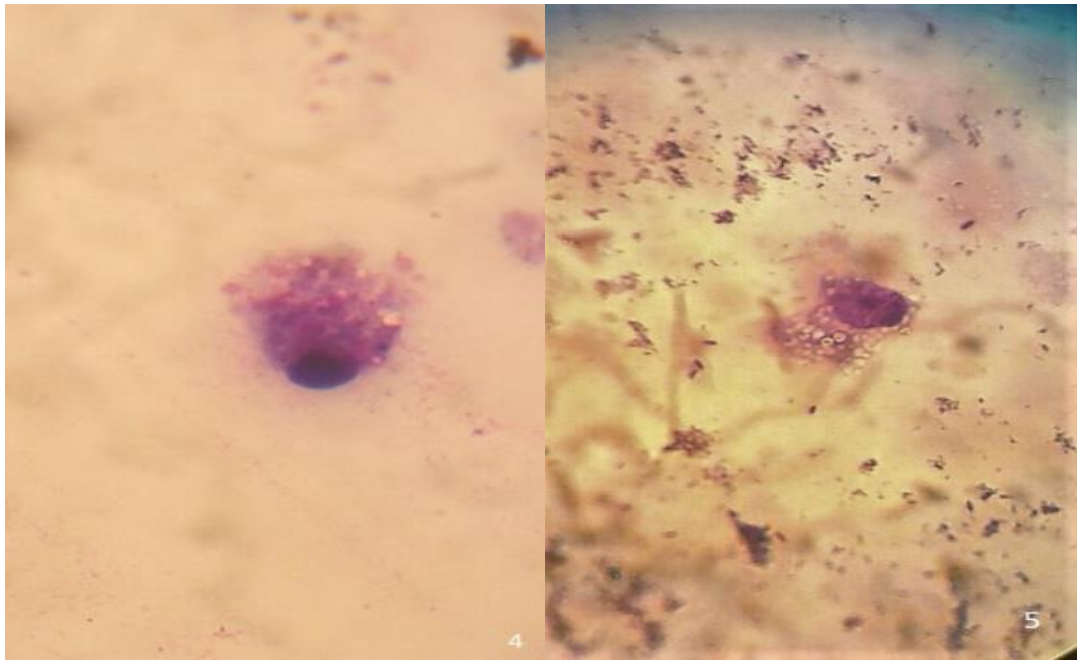
**Таблиця 3.6. Показники реакції бластної трансформації лімфоцитів крові самиць щурів та їхнього припліду на рослинний лектин та БАР МП**

Тварини	Лімфоцити, % / кл.×10 <sup>9</sup>	Група	Вид стимуляції лімфоцитів	Бласттрансформовані лімфоцити, %
Самиці	$70,80 \pm 0,99$ $4,90 \pm 0,24$	Контроль	СП	$8,21 \pm 0,49$
			КонА	$21,20 \pm 1,27^*$
			БАР МП	$13,10 \pm 0,79^*$
	$72,10 \pm 1,01$ $8,58 \pm 0,43^*$	Вплив водно- сольового екстракту	СП	$8,65 \pm 0,52$
			КонА	$23,10 \pm 1,39^*$
			БАР МП	$24,22 \pm 1,45^*, \#$
Приплід				
60-доба	$86,76 \pm 1,62$ $3,90 \pm 0,19$	Контроль	СП	$7,57 \pm 0,45$
			КонА	$14,09 \pm 0,84^*$
			БАР МП	$8,50 \pm 0,51$
	$74,01 \pm 1,80$ $5,33 \pm 0,27^*$	Вплив водно- сольового екстракту	СП	$9,51 \pm 0,57$
			КонА	$18,85 \pm 1,13^*, \#$
			БАР МП	$15,21 \pm 0,91^*, \#$
45-доба	$89,35 \pm 1,07$ $5,42 \pm 0,27$	Контроль	СП	$2,82 \pm 0,17$
			КонА	$9,00 \pm 0,54^*$
			БАР МП	$3,57 \pm 0,21$
	$84,45 \pm 1,74^*$ $5,52 \pm 0,28$	Вплив водно- сольового екстракту	СП	$5,15 \pm 0,31^{\#}$
			КонА	$12,10 \pm 0,73$
			БАР МП	$8,30 \pm 0,50^*, \#$

Примітки: СП – спонтанна РБТЛ (контроль), РБТЛ з лектином КонА; % - відносне значення, кл.×10<sup>9</sup> - абсолютне значення; \*- p<0,05 показники, що достовірно відрізняються від СП, #- p<0,05 показники, що достовірно відрізняються від контрольної групи [271].







**Рис. 3.4. Морфологічні форми бласттрансформованих лімфоцитів під впливом рослинного мітогену та БАР МП *Hirudo verbana* (об'єктив 100×, забарвлення за Романовським-Гімзою).** Типові бласттрансформовані лімфоцити під впливом: 1) КонА. Бласттрансформовані лімфоцити під впливом БАР МП *Hirudo verbana* із ознаками апоптозу: 2) вакуолізація цитоплазми та ядра; 3) ядро з одиночною протрузією, каріорексіс ядра нейтрофілів; 4, 5) вуалевидна цитоплазма з вакуолізацією [271].

### **Мітотичний індекс кісткового мозку самиць щурів та їхнього приплоду**

При аналізі проліферуючої активності клітин КМ (рис.3.5) у дослідній групі самиць МІ достовірно збільшувався на 33,61% порівняно с контрольною групою тварин ( $p < 0,05$ ) (табл.3.7) [2, 272].

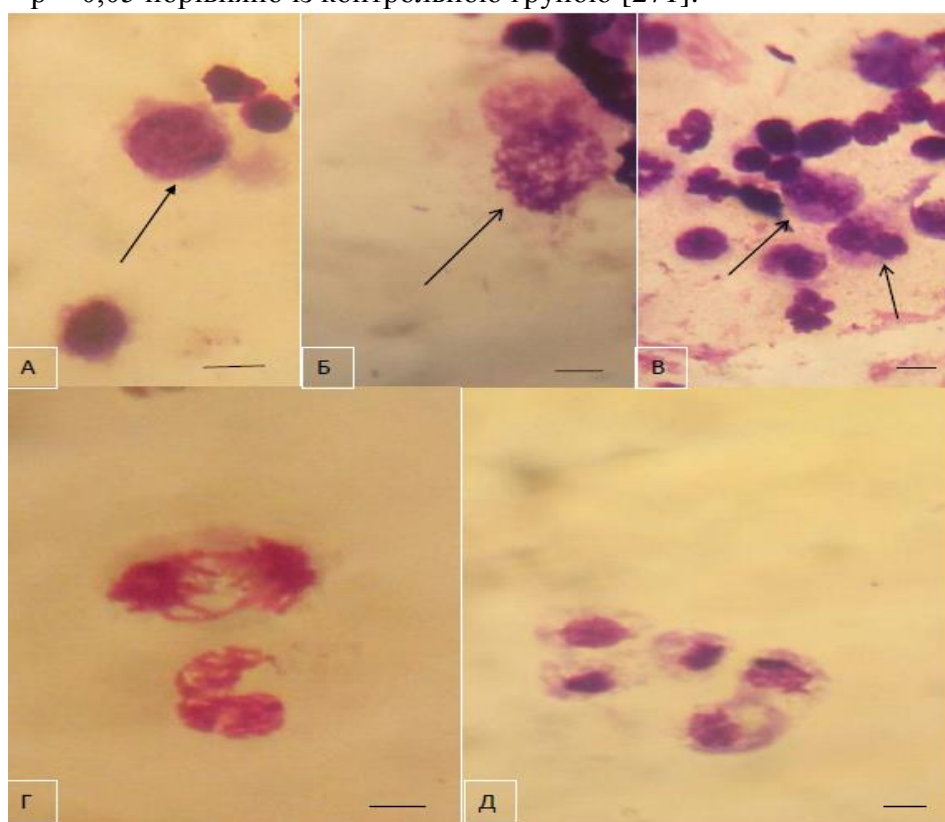
У їхнього приплоду максимально МІ підвищувався на першу добу (на 50,88%) порівняно с контрольною групою тварин ( $p < 0,05$ ) (табл.3.6).

Достовірно підвищувалася проліферативна активність клітин КМ і на 30 (на 25,67%) та 60 добу (на 18,35%) ( $p < 0,05$ ), порівняно з контрольною групою тварин. Тенденція до збільшення МІ спостерігалася на 15 (16,83%) та 45 добу (на 33,3%) (табл.3.7) [2, 272].

**Таблиця 3.7. Мітотична активність кісткового мозку самиць та їхнього приплоду за впливу водно-сольового екстракту**

Група тварин	Мітотичний індекс, ‰	
	Контроль	Вплив водно-сольового екстракту
Самиці	16,87 ± 1,77	23,15±1,84*
Приплід		
1 - доба	16,77 ± 0,97	34,22±3,65*
15 - доба	18,23 ± 0,20	21,92±2,14
30 - доба	11,05 ± 1,30	14,76 ± 0,48*
45 - доба	10,40 ± 0,23	16,16 ± 0,72
60 - доба	12,92 ± 0,66	15,83 ± 1,37*

Примітка: \* -  $p < 0,05$  порівняно із контрольною групою [271].

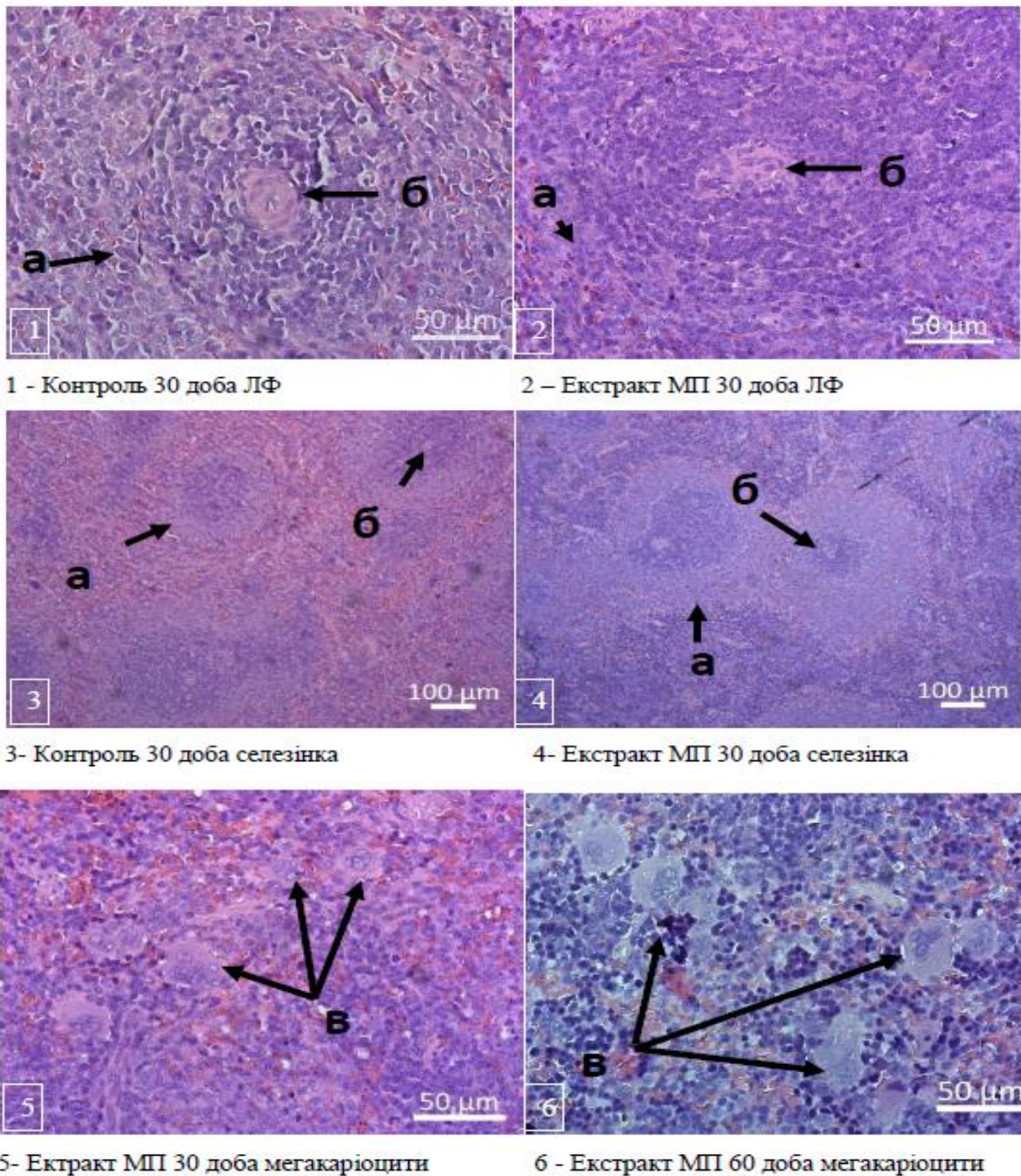


**Рис. 3.5. Стадії мітозу: а – інтерфаза, б - профаза, в – метафаза, г - анафаза, д – телофаза (чорними стрілками помічені клітини у різних стадіях мітозу); довжина бара – 10 мкм; забарвлення за методом Романовського-Гімза [272].**

### **Цитоморфологічні показники селезінки та тимусу самиць щурів та їхнього приплоду**

При дослідженні цитоморфологічних показників селезінки на фоні впливу водно-сольового екстракту БАР МП збільшувалася кількість лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм<sup>2</sup>) ЛФ, збільшувалася його площа та діаметр;

збільшувалася товщина, площа та діаметр ЦА ЛФ, порівняно з контрольною групою тварин  $p < 0,05$  (табл.3.8, 3.9 та рис. 3.6) [2, 273].



**Рис. 3.6.** Гістологічний препарат селезінки приплоду самиць щурів, котрі зазнали впливу водно-солового екстракту (1, 2, 5, 6 збільшення -  $\times 600$ , 3, 4 -  $\times 100$ ) [2, 273].

Примітка: а – лімфоїдний фолікул, б – артерія, в – мегакаріоцити, ЛФ –лімфоїдний фолікул.

У білій пульпі селезінки у самиць було зареєстроване збільшення площі (на 69,96 %) та діаметру (на 37,94 %) ЛФ (табл. 3.8); збільшення площі (на 63,89%), діаметру (на 46,42%) та товщини (на 48,52%) ЦА ЛФ (табл. 3.9) [2].

У їхнього приплоду на 15 добу відбувалося збільшення площі (на 43,77%) та діаметру (на 21,89%) ЛФ; на 30 добу збільшення площі (на 19,2%), діаметру (на 16,29%) та кількості лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм<sup>2</sup>) (на 35,75%) ЛФ; на 45 добу збільшення площі (на 49,26%), діаметру (на 20,52%) та кількості лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм<sup>2</sup>) (на 24,09 %) ЛФ; на 60 добу збільшення площі (на 32,04 %) та діаметру (на 10,82 %) ЛФ (табл. 3.8) [2, 273].

При дослідженні ЦА у ЛФ відмічалася тенденція до збільшення їх площі, довжини та товщини у самиць (на 63,9 %, 46,4 % та 48,5 % відповідно) та їхнього приплоду на 15 (на 43,2 %, 28,3 % та 37,5 % відповідно) та 30 (на 34,2 %, 26,7 % та 9,8 % відповідно) добу (табл. 3.9) [2]. Тимус самиць зазнавав інволюції, а у приплоду в корковій та мозковій речовинах збільшувалася кількість клітин на одиницю площі (400 мкм<sup>2</sup>), переважала коркова над мозковою речовиною, що свідчило про стимулюючий вплив БАРМП *Hirudo verbana* на вторинний (селезінку) та первинний (тимус) орган імунної системи (рис. 3.6, А, Б). У корковій речовині тимусу приплоду збільшувалася кількість клітин на одиницю площі на 15 (10,99%), 30 (11,20%), 45 (20,82 %) та 60 (24,38 %) добу (рис. 3.7, А). У мозковій речовині тимусу приплоду збільшувалася кількість клітин на одиницю площі на 30 (5,54 %) (рис. 3.7, Б) [2, 273].

**Таблиця 3.8. Морфологічні показники лімфоїдних фолікулів білої пульпи селезінки самиць та їхнього приплуду за впливу водно-сольового екстракту**

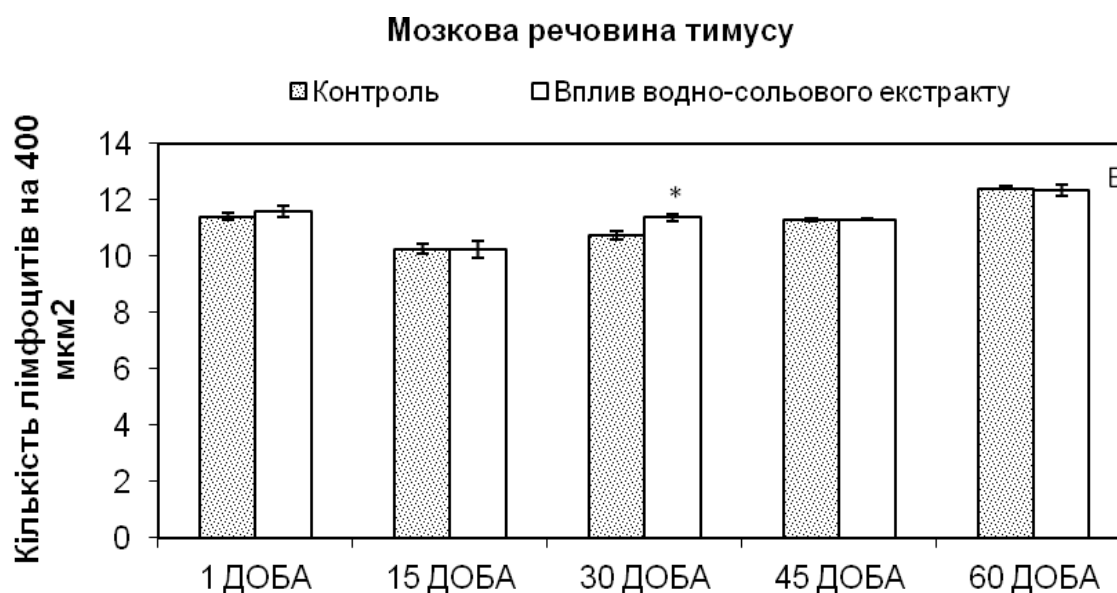
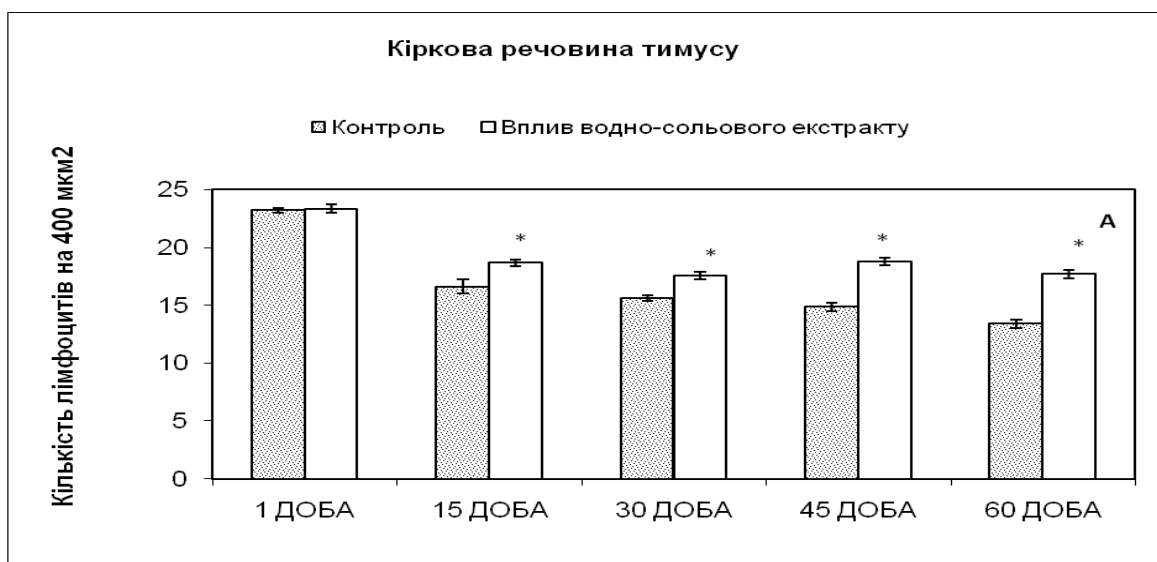
Група тварин		Лімфоїдний фолікул			
		Площа, мкм <sup>2</sup>	Діаметр мкм	Кількість лімфоцитів на 400 мкм <sup>2</sup> ЛФ	Кількість макрофагів на 400 мкм <sup>2</sup> ЛФ
Самиці	Контроль	15302,26±1353,87	137,80±15,85	16,09±0,54	відсутні
	Вплив водно-сольового екстракту	50944,83±1976,2*	222,06±21,29*	15,35±0,57	відсутні
Приплід					
1 – доба	Контроль	5550,39±785,11	75,85±0,82	7,73±0,78	відсутні
	Вплив водно-сольового екстракту	5287,69±736,93	75,48±4,81	10,12±0,37*	відсутні
15 - доба	Контроль	18936,12±2033,77	154,83±14,10	10,97±0,30	0,22±0,05
	Вплив водно-сольового екстракту	33676,78±3079,29*	198,23±21,74*	11,00±0,49	0,19±0,01
30 - доба	Контроль	23293,00±1943,40	167,00±11,90	8,41±0,31	0,20±0,03
	Вплив водно-сольового екстракту	28843,22±1945,30*	199,50±9,03*	13,09±0,30*	0,17±0,03
45 - доба	Контроль	52346,98±7780,70	275,27±37,60	12,29±0,27	відсутні
	Вплив водно-сольового екстракту	103160,00±9333,34*	346,35±23,66*	16,19±0,54*	відсутні
60 - доба	Контроль	35263,22±3292,03	238,20±18,30	11,32±0,84	0,58±0,13
	Вплив водно-сольового екстракту	51886,10±3888,65*	267,11±18,7*	12,73±0,83	0,68±0,2

Примітка: \* -  $p < 0,05$  порівняно із контрольною групою [2, 273]

**Таблиця 3.9. Морфологічні показники центральних артерій лімфодних фолікулів білої пульпи селезінки самиць та їхнього приплуду за впливу водно-сольового екстракту**

Група тварин		Центральна артерія		
		Площа, мкм <sup>2</sup>	Діаметр мкм	Товщина мкм
Самиці	Контроль	831,46±165,88	27,12±2,16	9,42±0,60
	Вплив водно-сольового екстракту	2302,41±439,15*	50,62±5,07*	18,30±3,25*
Приплід				
1 - доба	Контроль	373,51±83,32	21,36±2,56	5,50±2,00
	Вплив водно-сольового екстракту	349,00±60,00	21,00±1,80	9,60±0,80*
15 - доба	Контроль	819,65±170,80	29,81±3,23	10,22±1,62
	Вплив водно-сольового екстракту	1442,69±208,62	41,58±5,19*	16,35±2,83*
30 - доба	Контроль	479,50±83,94	23,02±2,20	7,72±0,31
	Вплив водно-сольового екстракту	728,40±69,50*	31,40±1,94*	8,56±0,30*
45 - доба	Контроль	1314,23±484,50	36,98±6,21	11,57±1,12
	Вплив водно-сольового екстракту	1348,45±211,73	39,76±3,23	15,15±1,37*
60 - доба	Контроль	817,98±286,57	30,64±5,03	5,65±0,87
	Вплив водно-сольового екстракту	819,078±382,36	29,23±6,14	8,10±1,21*

Примітка: \* -  $p < 0,05$  порівняно із контрольною групою [2].



**Рис. 3.7.** Кількість лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм<sup>2</sup>) речовин тимусу приплоду, які піддавалися впливу водно-сольового екстракту. А – коркова речовина, Б – мозкова речовина [2].

Примітка: \* -  $p < 0,05$  порівняно із контрольною групою.

### **Кореляційний взаємозв'язок між показниками**

Дослідження кореляційних взаємозв'язків між ваговими показниками тіла та лімфоїдних органів у приплоду щурів, котрі зазнали впливу водно-сольовим екстрактом БАР МП у перикоїтальному періоді, також підтверджує взаємозв'язок між загальним морфогенезом та морфогенезом в імунній системі цих тварин [2]. Отримані результати засвідчують позитивний вплив БАР МП, отриманих самицями, на загальний морфогенез та морфогенез лімфоїдних

органів їхнього приплоду. У приплоду самиць дослідної групи була виявлена гармонізація розвитку тимусу та селезінки, порівняно з новонародженими щурами контрольної групи, про що свідчило підвищені показники позитивного кореляційного взаємозв'язку між ваговими індексами цих органів (табл. 3.10) [2]. Слід відмітити достовірні відмінності між показниками кореляційного взаємозв'язку між загальним ваговим показником та ваговими показниками аналізованих лімфоїдних органів у самиць та їхнього приплоду порівняно з контрольною групою тварин. Участь в морфогенезі не тільки центрального лімфоїдного органу - тимусу, але і лімфоїдної частини периферичного органу - селезінки, можна пояснити способом та дозованим введення водно-сольового екстракту МП [2]. При внутрішньочеревному введенні БАР переважно надходять в периферичний венозний кровотік, активну участь в дренажі, якого приймає периферичний лімфоїдний орган - селезінка [2]. Стимуляція ЛФ селезінки БАР водно-сольовим екстрактом відбувалося у ембріонів ще в перші два тижні вагітності. Дане припущення підтверджується при аналізі кореляційних зв'язків показників у їхнього приплоду. Високий позитивний зв'язок між цими показниками, також прямо вказує на залежність гістогенетичних реакцій від функціонального стану досліджуваних центрального та периферичного органів імунної системи тварин [2].

**Таблиця 3.10. Кореляція між показниками вагою тіла та вагою лімфоїдних органів самиць та їхнього приплоду за впливу водно-сольового екстракту, r**

Показники	Група тварин	Самиці	Приплід				
			1 - доба	15 - доба	30 - доба	45 - доба	60 - доба
Вага тимусу – вага селезінки	Контроль	1,00*	0,69*	0,18	0,00	0,09	0,46*
	Вплив водно-сольового екстракту	1,00*	0,53*	0,99*	0,58*	-0,08	0,57*
Вага тіла – вага тимусу	Контроль	-0,03	0,00	0,95*	0,77*	0,09	0,74*
	Вплив водно-сольового екстракту	0,71*	0,56*	0,88*	0,00	-0,32	0,78*
Вага тіла – вага селезінки	Контроль	-0,03	0,00	0,48*	0,00	0,13	0,54*
	Вплив водно-сольового екстракту	0,69*	0,96*	0,84*	0,00	-0,04	0,80*

Примітка: \* – достовірний кореляційний зв'язок між показниками [2].



## **РОЗДІЛ 4. МОРФОМЕТРИЧНІ, МОРФОЛОГІЧНІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ ЩУРІВ НА ФОНІ ГІРУДОЛОГІЧНОГО ВПЛИВУ**

Дослідження цього розділу були присвячені вивченню ГВ МП виду *Hirudo verbana* на кількісні та функціональні показники лейкоцитів периферичної крові, проліферативну активність кісткового мозку, морфометричні параметри тіла, морфометричні, морфологічні та цитологічні показники лімфоїдних органів імунної системи самиць щурів та їхнього приплоду: на 1, 15, 30, 45 та 60 добу [2].

### **Схема експериментальних досліджень**

В експеримент було взято 40 лабораторних нелінійних білих щурів-самиць та їхнього приплоду (n=400) в динаміці: на 1, 15, 30, 45 та 60 добу [2].

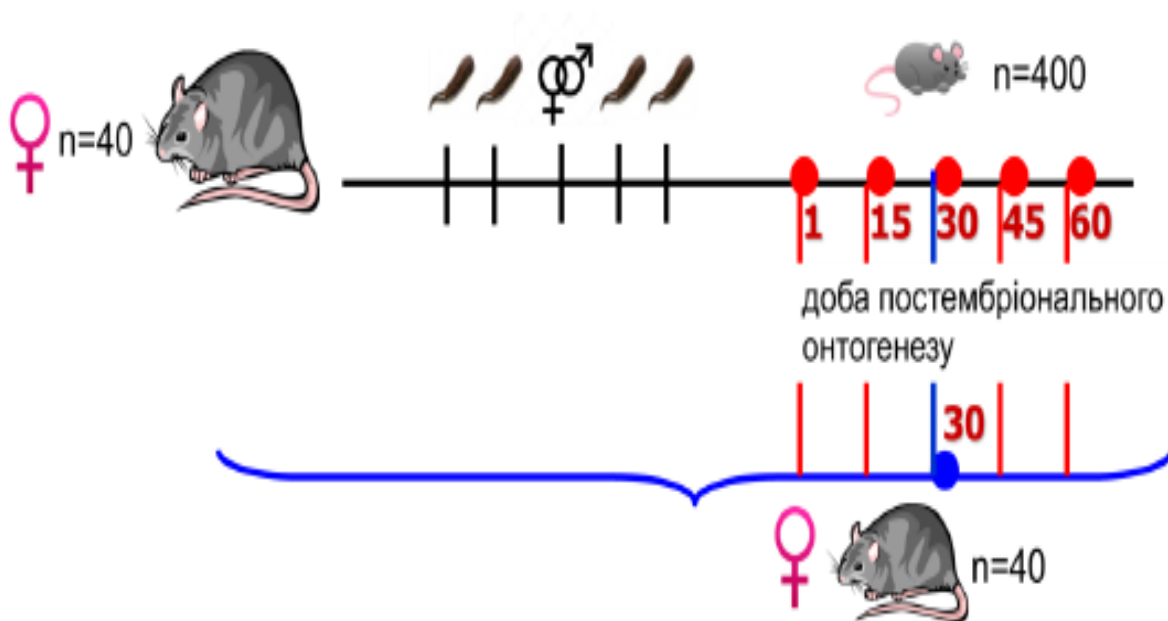
Тварини були розподілені з використанням принципу рандомізації на 2 групи, кожна з яких містила по 20 щурів-самиць рис. 4.1:

1) контрольна група щурів-самиць, яких піддавали тільки короточасному фіксуванню;

2) дослідна група щурів-самиць, яким здійснювався гірудологічний вплив (чотириразова приставка по 1 голодній МП, один раз на тиждень): двічі до спарювання та двічі – після спарювання. [2].

Для спарювання двох груп було взято 40 нелінійних білих щурів-самців. Маніпуляцію приставки МП проводилися швидко, на поголену загривкову ділянку, шляхом короточасного фіксування тварини в станку [274], після присмокування повний акт годування тривав приблизно 25-30 хв. Після відпадання МП від тіла щура ранка присипалася стерильним порошком крейди. Кожен із дослідних щурів після приставки МП перебував в індивідуальній клітці до загоєння ранки [2].

Стан імунної системи самиць характеризували після вигодовування та відсадки від них їхнього приплоду. Стан імунної системи приплоду характеризували в динаміці: на 1, 15, 30, 45 та 60 добу. Тварин виводили з експерименту шляхом дислокації шийних хребців із наступною декапітацією [2].



### Дослідження:

- вагових показників тіла;
- вагових показників та цитоморфологічних характеристик лімфоїдних органів;
- мітотичного індексу кісткового мозку;
- гематологічних показників;
- фагоцитарної активності нейтрофілів;
- оксидативного метаболізму нейтрофілів;
- проліферативної активності лімфоцитів.

● часова точка збору біологічного матеріалу у самиць

● часові точки збору біологічного матеріалу у приплоду

грудологічний вплив

Рис. 4.1. Схеми проведених експериментальних досліджень

## **Гематологічні, морфометричні показники тіла та лімфоїдних органів самиць щурів та їхнього приплоду**

У дослідних самиць щурів було зареєстроване збільшення усіх морфометричних параметрів тіла (табл. 4.1), але найбільша амплітуда приросту відзначалася для ваги тіла, яка збільшувалася в порівнянні з контрольною групою тварин на 7,5%, що мабуть могло відбуватися зарахунок підвищення ваги лімфоїдних органів та тих органів, які вони стимулювали [2, 275].

Застосування ГВ у передкоїтальному та після коїтальному періодах самицям було асоційоване зі збільшенням ваги їхнього приплоду в динаміці постнатального онтогенезу. Найбільшою мірою вага приплоду у тварин, що зазнали ГВ, відрізнялася у підсисному періоді на 15 добу (на 15,2%), в період початку на 30 добу (на 24,2%), а також в кінці статевого дозрівання на 60 добу (на 13,8%), в порівнянні з контрольною групою тварин. Отримані дані можуть вказувати на позитивний ефект ГВ, щодо грудного вигодовування та формування гормональних систем приплоду [2].

При аналізі лімфоїдних органів (тимусу та селезінки) у дослідних самиць щурів зареєстроване збільшення вагових показників тимусу на 34,5% (табл. 4.2) та селезінки - на 19,8%, ( $p < 0,05$ ) (табл.4.3) [2].

Позитивні зміни морфометричних параметрів лімфоїдних органів при імуностимуляції порівняно з контрольною групою тварин було відмічено і іншими роботами учених [276-278]. У приплоду різного періоду онтогенезу було відмічене збільшення усіх морфометричних показників лімфоїдних органів (табл. 4.2 та 4.3). Максимальне збільшення зареєстроване при аналізі їх вагових показників: тимусу: на 15 добу – 28,12%, на 30 добу – 49,83%, на 45 добу 16,87 % (табл. 4.2); селезінки: на 15 добу – 50,39 %, на 30 добу – 49,78 %, на 45 добу – 54, 81% ( $p < 0,05$ ) (табл. 4.3) [2].

**Таблиця 4.1. Морфометричні параметри тіла самиць та їхнього приплоду після гірудологічного впливу**

Параметри тіла						
Група тварин		Вага тіла (г)	Довжина тіла (см)	Довжина хвоста (см)	Окружність грудної клітки (см)	Окружність живота (см)
Самиці	Контроль	243,45±10,44	19,69±0,90	16,92±0,36	16,13±0,43	18,38±0,37
	Гірудовплив	261,50±7,18*	21,48±1,00	18,79±0,29*	17,12±0,27*	20,28±0,32*
Приплід						
1 - доба	Контроль	5,97±0,21	5,03±0,25	1,60±0,08	4,88±0,50	5,07±0,40
	Гірудовплив	6,85±0,27*	5,30±0,30	1,89±0,09*	5,00±0,70	5,19±0,20*
15 - доба	Контроль	21,47±1,38	8,28±0,43	5,07±0,25	6,93±0,22	7,82±0,23
	Гірудовплив	24,74±1,00*	8,58±0,40	4,94±0,15	8,05±0,17*	8,45±0,20*
30 - доба	Контроль	48,22±2,10	11,00±0,50	8,02±0,50	8,65±0,30	10,02±0,40
	Гірудовплив	59,88±2,30*	12,85±0,70*	9,42±0,60*	9,58±0,90*	11,13±0,40*
45 - доба	Контроль	105,38±7,18	15,26±0,40	14,15±0,33	11,82±0,22	13,34±0,38
	Гірудовплив	123,14±5,15*	16,00±0,24	14,40±0,41	12,49±0,29*	14,15±0,33*
60 - доба	Контроль	146,26±4,51	16,90±0,28	15,24±0,19	13,00±0,20	14,19±0,20
	Гірудовплив	166,48±6,31*	18,31±0,33*	16,08±0,20*	14,19±0,31*	15,80±0,33*

Примітка: \* -  $p < 0,05$  порівняно із контрольною групою [2].

**Таблиця 4.2. Морфометричні показники центрального лімфоїдного органу імунної системи самиць та їхнього приплоду після гірудологічного впливу**

Група тварин		Морфометричні показники тимусу		
		Вага (мг)	Довжина (см)	Ширина (см)
Самиці	Контроль	169,65±9,9	0,92±0,09	0,92±0,08
	Гірудовплив	228,15±15,54*	1,10±0,10	1,11±0,10*
Приплід				
1 - доба	Контроль	9,41±0,96	0,22±0,04	0,20±0,04
	Гірудовплив	15,32±1,24*	0,34±0,05*	0,29±0,04*
15 - доба	Контроль	70,75±6,89	0,77±0,07	0,71±0,07
	Гірудовплив	90,65±6,81*	0,87±0,04*	0,73±0,08
30 - доба	Контроль	110,00±5,32	1,00±0,10	0,90±0,08
	Гірудовплив	164,81±9,76*	1,18±0,10	1,21±0,12*
45 - доба	Контроль	272,85±13,7	1,31±0,11	1,40±0,13
	Гірудовплив	335,70±15,97*	1,51±0,12*	1,60±0,13*
60 - доба	Контроль	396,97±17,43	1,53±0,12	1,58±0,11
	Гірудовплив	404,80±18,43	1,73±0,14*	1,80±0,16*

Примітка: \* -  $p < 0,05$  порівняно із контрольною групою [2].

Застосування ГВ самицям щурів спричинило зміни кількісних показників лейкоцитів периферичної крові, еритроцитів та вмісту гемоглобіну (табл. 4.4). Кількість лейкоцитів у крові самиць, котрі зазнали ГВ збільшувалася на 54%, кількість еритроцитів на 24%, вміст гемоглобіну на 16% ( $p < 0,05$ ). У той час, як лейкоцитарна формула крові залишалася статистично незмінною (табл. 4.5) [2, 275]. У приплоді контрольної групи досліджені показники гемограми

**Таблиця 4.3. Морфометричні показники периферичного лімфоїдного органу імунної системи самиць та їхнього приплоду після гірудологічного впливу**

Група тварин		Морфометричні показники селезінки		
		Вага (мг)	Довжина (см)	Ширина (см)
Самиці	Контроль	579,42±25,33	3,44±0,20	0,80±0,04
	Гірудовплив	694,20±27,43*	3,59±0,21	0,91±0,05*
Приплід				
1 - доба	Контроль	15,25±0,80	0,83±0,05	0,19±0,04
	Гірудовплив	21,25±2,63*	1,05±0,09*	0,25±0,05
15 - доба	Контроль	56,52±4,69	1,37±0,10	0,39±0,04
	Гірудовплив	85,00±5,34*	1,69±0,13*	0,44±0,05*
30 - доба	Контроль	116,2±5,81	1,90±0,16	0,49±0,05
	Гірудовплив	174,05±8,89*	2,24±0,22*	0,61±0,04*
45 - доба	Контроль	427,80±45,14	2,79±0,24	0,68±0,03
	Гірудовплив	662,30±30,44*	3,40±0,33*	0,96±0,06*
60 - доба	Контроль	524,10±23,87	3,04±0,31	0,75±0,05
	Гірудовплив	753,50±43,75*	3,62±0,29*	0,96±0,07*

Примітка: \* -  $p < 0,05$  порівняно із контрольною групою [2].

**Таблиця 4.4. Загальна кількість лейкоцитів та еритроцитів, гемоглобін, кольоровий показник у самиць щурів та їхнього приплоду після гірудологічного впливу**

Доба	Група тварин	Показники			
		лейкоцити, $\times 10^9/\text{л}$	еритроцити, $\times 10^{12}/\text{л}$	гемоглобін, г/л	кольоровий показник, %
Самиці	Контроль	5,02 ± 0,25	7,08 ± 0,40	136,1 ± 4,8	0,58 ± 0,04
	Гірудовплив	8,16 ± 0,66*	8,78 ± 0,29*	158,4 ± 3,6*	0,54 ± 0,02
Приплід					
1 - доба	Контроль	5,85 ± 0,35	2,84 ± 0,10	62,7 ± 2,7	0,66 ± 0,12
	Гірудовплив	7,68 ± 0,55*	3,11 ± 0,22	83,8 ± 2,7	0,81 ± 0,10
15 - доба	Контроль	6,74 ± 0,54	4,16 ± 0,18	79,5 ± 1,6	0,57 ± 0,06
	Гірудовплив	7,87 ± 0,51*	3,69 ± 0,29	86,2 ± 3,5*	0,70 ± 0,01
30 - доба	Контроль	3,39 ± 0,30	3,79 ± 0,13	90,9 ± 3,1	0,72 ± 0,05
	Гірудовплив	5,43 ± 0,29*	4,76 ± 0,22*	102,0 ± 3,4	0,64 ± 0,04
45 - доба	Контроль	6,81 ± 0,51	5,20 ± 0,14	143,2 ± 5,4	0,83 ± 0,09
	Гірудовплив	7,12 ± 0,31	5,07 ± 0,33	140,5 ± 6,1	0,83 ± 0,08
60 - доба	Контроль	7,29 ± 0,45	6,65 ± 0,19	155,1 ± 5,7	0,70 ± 0,06
	Гірудовплив	8,23 ± 0,45	6,46 ± 0,20	153,3 ± 5,0	0,71 ± 0,05

Примітка: \* -  $p < 0,05$  порівняно із контрольною групою [2, 274].

знаходилися в межах референтних значень для даного віку [279]. У приплоду самиць, котрі зазнали ГВ, було зареєстровано збільшення загальної кількості лейкоцитів на всіх етапах постнатального онтогенезу: на 1 (на 23,8 %), 15 (на 14,3 %), 30 (на 37,5 %), 45 (на 4,3 %) та 60 добу (на 11,4 %), а також збільшення вмісту гемоглобіну [2].

**Таблиця 4.5. Лейкоцитарна формула крові самиць та їхнього приплоду після гірудологічного впливу**

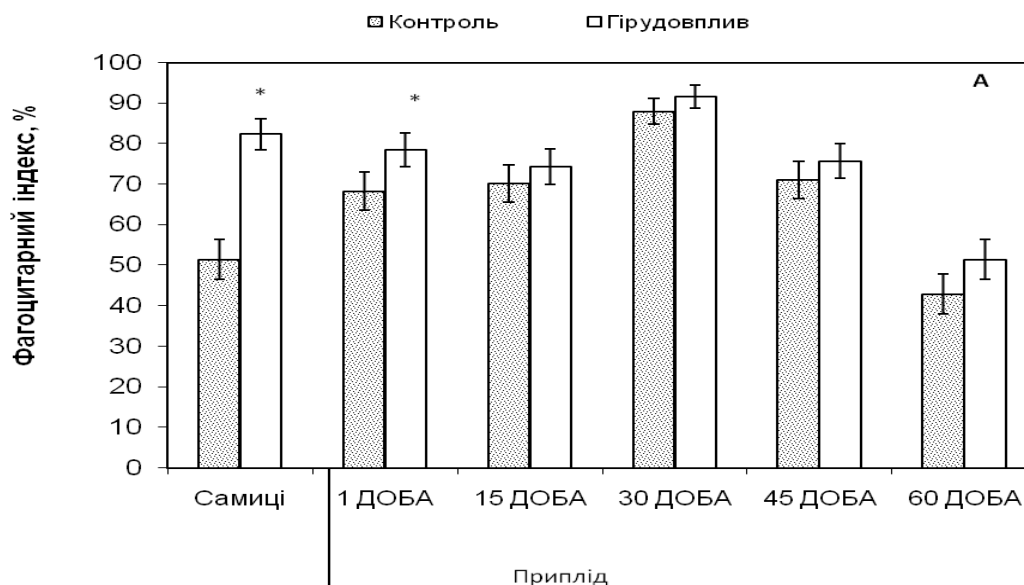
Група тварин		Лейкоцитарна формула крові, %							Моноцити	Еозинофіли
		Нейтрофіли			Лімфоцити	Загальний відсоток	Моноцити	Еозинофіли		
		Паличкоядерні	Сегментоядерні	Загальний відсоток						
Самиці	Контроль	12,01±2,71	14,40± 3,5	26,41±4,15	70,16±4,57	3,40±2,62	відсутні			
	Гірудовплив	12,61±3,32	13,90±3,46	26,51±4,41	70,31±4,46	2,26±1,49	0,46±0,06*			
Приплід										
1 - доба	Контроль	8,68±2,81	43,29±4,95	51,97±5,00	46,76±4,99	1,25±1,11	відсутні			
	Гірудовплив	9,92±2,99	41,95±4,93	51,87±5,00	46,8±4,99	1,18±1,08	0,17±0,02*			
15 - доба	Контроль	4,95±2,17	16,62±3,72	21,57±4,11	76,9±4,03	1,51±1,20	відсутні			
	Гірудовплив	5,87±2,35	14,22±3,49	20,09±4,00	79,58±4,03	0,62±0,05	відсутні			
30 - доба	Контроль	5,10±2,2	11,90±3,24	17,00±3,76	81,87±3,85	0,47±0,06*	0,63±0,05*			
	Гірудовплив	4,66±2,11	15,97±3,66	20,63±4,05	78,93±4,08	0,10±0,01	0,09±0,01			
45 - доба	Контроль	2,69±1,62	10,32±3,04	13,01±3,30	85,86±3,48	1,24±1,10	0,01±0,005			
	Гірудовплив	6,43±2,45	11,53±3,06	17,96±3,75	81,40±3,81	0,17±0,02	0,17±0,02*			
60 - доба	Контроль	3,64±1,87	8,20±2,75	11,84±3,24	86,68±3,5	1,47±1,10	відсутні			
	Гірудовплив	3,70±1,89	12,48±3,30	16,18±3,56	82,9±3,76	1,04±1,10	відсутні			

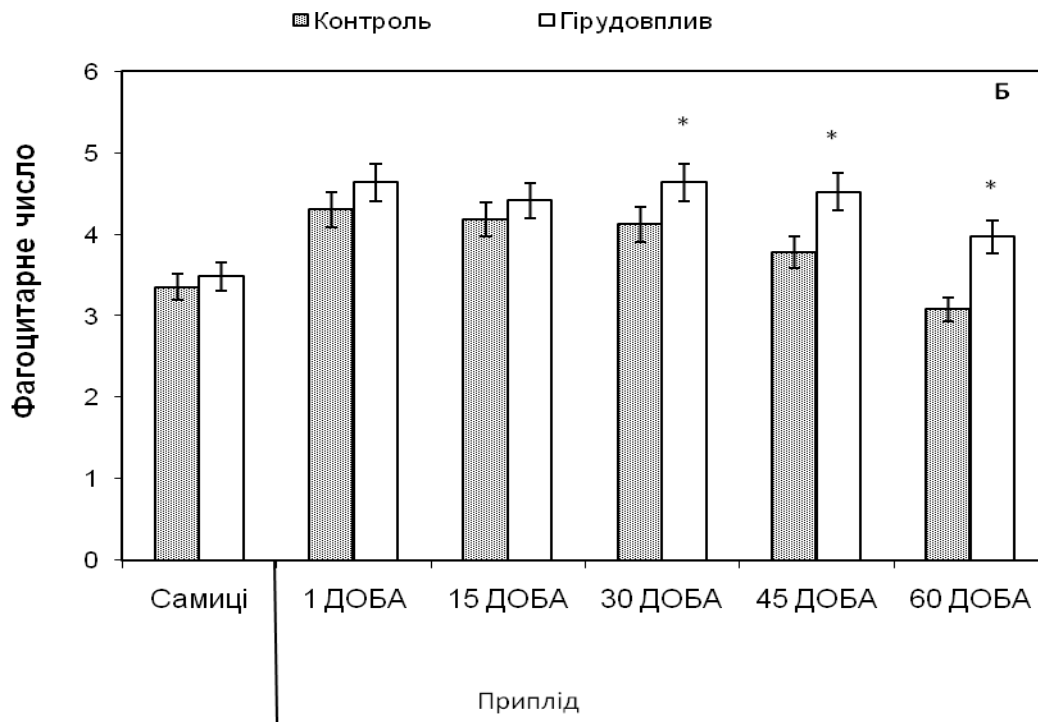
Примітка: \* -  $p < 0,05$  порівняно із контрольною групою [2].

Слід відмітити, що, незважаючи на вірогідне збільшення кількісного показника циркулюючих лейкоцитів у приплоду, котрі зазнали ГВ, було відсутнє відхилення у їхній лейкоцитарній формулі крові. У самиць та приплоду була незначна тенденція до збільшення еозинофілів, що може свідчити про імунологічну відповідь на ектопаразитизм. Звісно, в захисті від еукаріотичних паразитів активну участь, окрім інших клітин значну роль відіграють і еозинофіли [2].

### Поглиналина активність та оксидативний метаболізм нейтрофілів крові самиць та їхнього приплоду

Збільшення частки активованих до фагоцитозу циркулюючих нейтрофілів – це ознака їх прозапальної активності. При аналізі цього показника у самиць шурів, що зазнали ГВ, було зареєстроване достовірне зниження його числових значень [2]. Аналогічний феномен було виявлено і у їхнього приплоду у ранньому постнатальному періоді. ФІ досягав статистичного значущого рівня у самиць (на 37,49%) та у їхнього приплоду на 1 добу (на 12,89%), а ФЧ на 45 (на 16,37 %) та 60 (на 22,42 %) добу (рис. 4.2, А, Б). Такі зміни показників ФАН можуть бути пов'язані з активацією вродженого імунітету під впливом БАР МП [2, 275].





**Рис. 4.2. Фагоцитарна активність нейтрофілів крові самиць та їхнього приплоду після гірудологічного впливу. А – фагоцитарний індекс, Б – фагоцитарне число [2].**

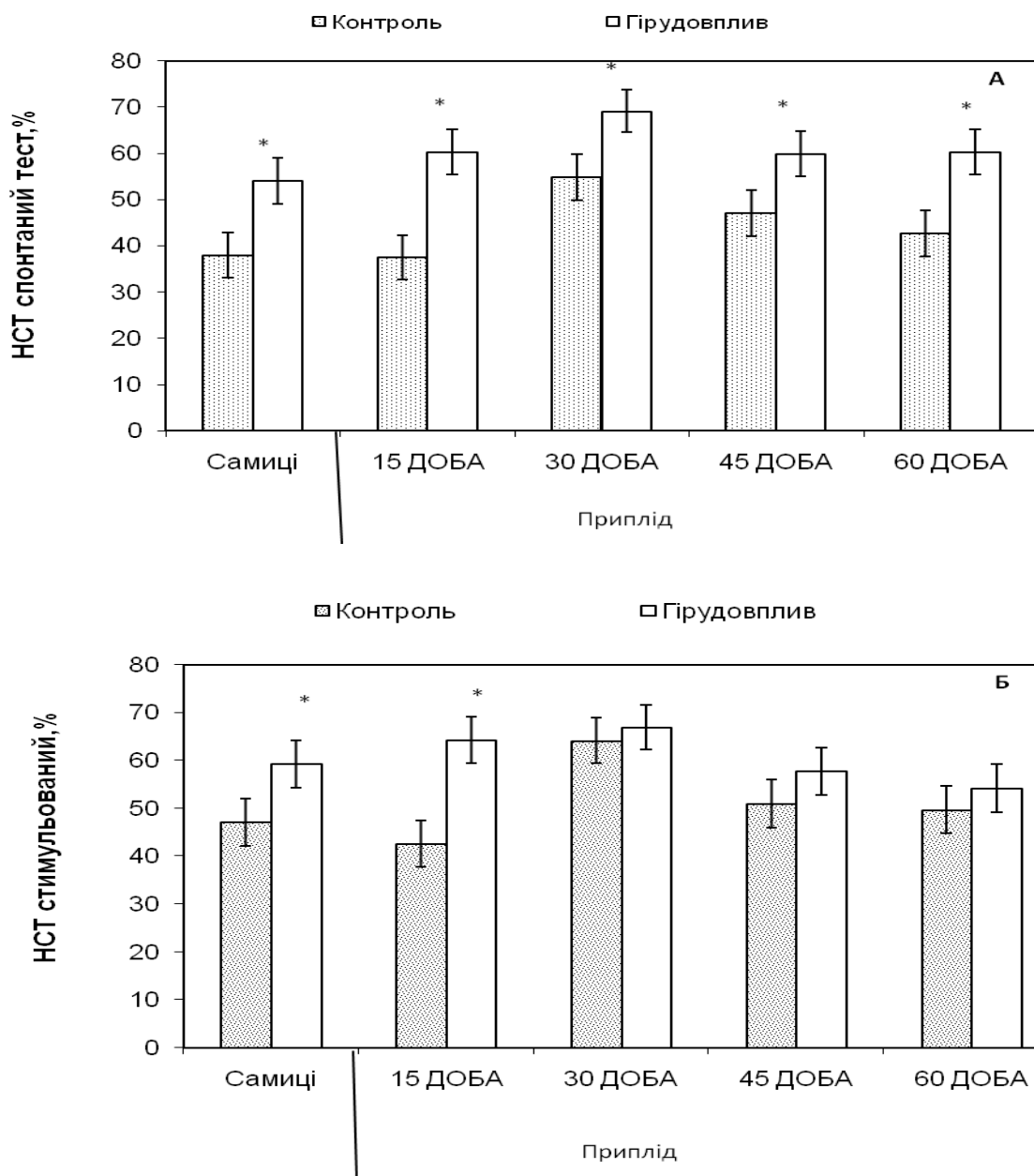
Примітка: \* -  $p < 0,05$  порівняно із контрольною групою.

При дослідженні ОМН у самиць, які зазнали ГВ, та їхнього приплоду було відмічено збільшення спонтанного НСТ-тесту у самиць (на 29,80%) та їхнього приплоду: на 15 (на 37,84 %), 30 (на 20,64 %), 45 (на 21,42 %) та 60 (на 29,14 %) добу, таке ж збільшення було зареєстроване і при аналізі показників стимульованого НСТ-тесту: у дослідних самиць на 20,49% та у їхнього приплоду на 15 добу (на 33,73 %) (рис. 4.3, А, Б) [2, 275].

Отримані дані можуть свідчити про позитивний вплив БАР МП на оксидативний метаболізм поліморфнооядерних фагоцитів та метаболічний резерв їхньої функції.

Слід зазначити, що стимуляторний ефект на оксидативний метаболізм нейтрофілів спостерігався у приплоду навіть у віддалені терміни після проведення ГВ. Натомість, позитивний ефект ГВ на функціональний резерв ОМН приплоду був короткотривалим [2].





**Рис. 4.3.** Оксидативний метаболізм нейтрофілів крові самиць та їхнього приплоду після гірудологічного впливу. А – НСТ спонтаний, Б – НСТ стимульований [2].

Примітка: \* -  $p < 0,05$  порівняно із контрольною групою.

### Проліферативна активність лімфоцитів крові самиць та їхнього приплоду

Про функціональну активність Т - і В - лімфоцитів можна судити з РБТЛ із використанням мітогенів. Стимульована бластна трансформація лімфоцитів з рослинними мітогенами (ФГА, Кона) характеризує функціональну здатність Т -лімфоцитів до трансформації та розмноженню під впливом алергенів,

антигенів та мітогенів. Тим самим, РБТЛ дає змогу своєчасно виявити порушення адаптивної ланки імунітету та своєчасно діагностувати захворювання [2, 280].

Підвищена спонтанна проліферація лімфоцитів (бласттрансформація) може бути у обстеженого, який переніс багатократні переливання крові, хворіє алергічними та аутоімунними захворюваннями, при бактерійних та вірусних інфекціях, а також у новонароджених.

Зниження проліферативної відповіді на мітоген КонА, може свідчити про наявність імунодефіцитного стану. Низька відповідь в РБТЛ може корелювати з дефіцитом Т - клітин в периферичній крові або зі зміною показника CD4/CD8 на користь клітин-регуляторів CD25.

В деяких випадках (наприклад, в період відновлення після опромінення або інтенсивної хіміотерапії) низька відповідь на Т - клітинні мітогени може бути пов'язана з викидом в периферичну кров великої кількості незрілих Т - клітин. Низька відповідь в РБТЛ може бути також обумовлена порушенням продукції лімфокінів, таких як ІЛ-1 та ІЛ-2 [2, 281-283].

При дослідженні у статевозрілих самиць шурів спостерігалось значне збільшення відсотку бласттрансформованих лімфоцитів при стимуляції рослинним мітогеном та БАР водно-сольового екстракту МП (табл. 4.6) порівняно зі спонтанною культурою у дослідних та контрольних групах тварин ( $p < 0,05$ ).

У контрольній групі: на стимуляцію КонА зростала кількість бласттрансформованих лімфоцитів на 65,20 %, при БАР МП стимуляції зростали на 75,13 %, а у дослідній групі: на стимуляцію КонА зростали бласттрансформовані лімфоцити на 51,87 %, при стимуляції БАР МП на 65,32 %.

При дослідженні приплоду: у контрольних групах значно підвищувалися РБТЛ на стимуляцію КонА ( $p < 0,05$ ) (табл. 4.6), а при стимуляції БАР МП, культура статистично не відрізнялася від спонтанних культур (табл. 4.6). При порівнянні груп між собою: у дослідній групі у всіх культурах крові статевозрілих самиць та у їхнього приплоду спостерігалось значне збільшення бласттрансформованих лімфоцитів порівняно з контрольною групою тварин ( $p < 0,05$ ).

У дослідних культурах РБТЛ на БАР МП стимуляцію наближалася до показників рослинного лектину КонА. РБТЛ морфологічно відрізнялася: бласти

стимульовані рослинним лектином були типовими, що свідчило про продуктивний лімфогенез.

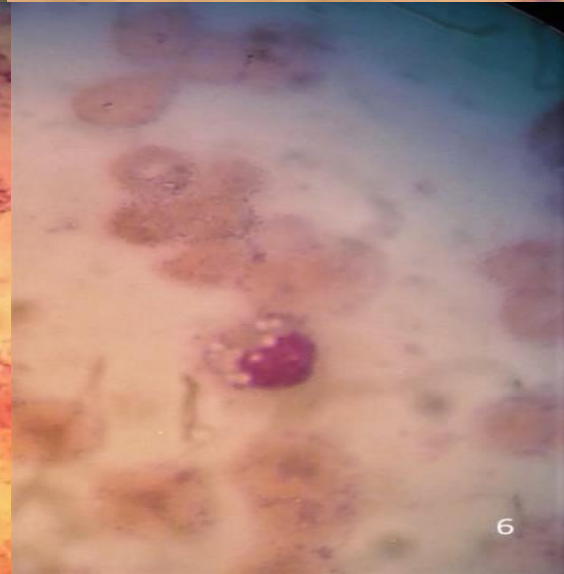
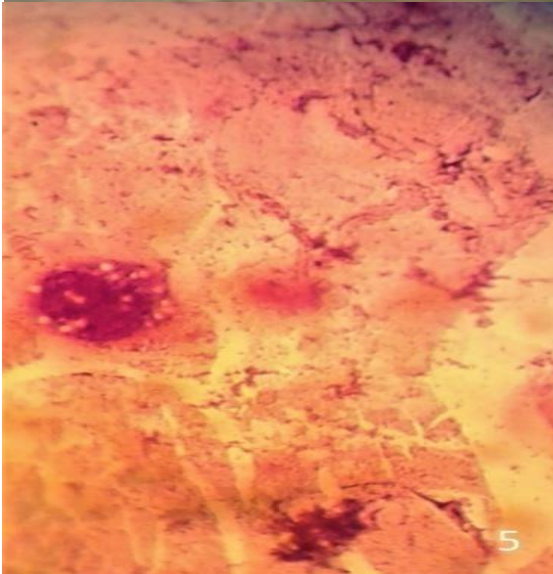
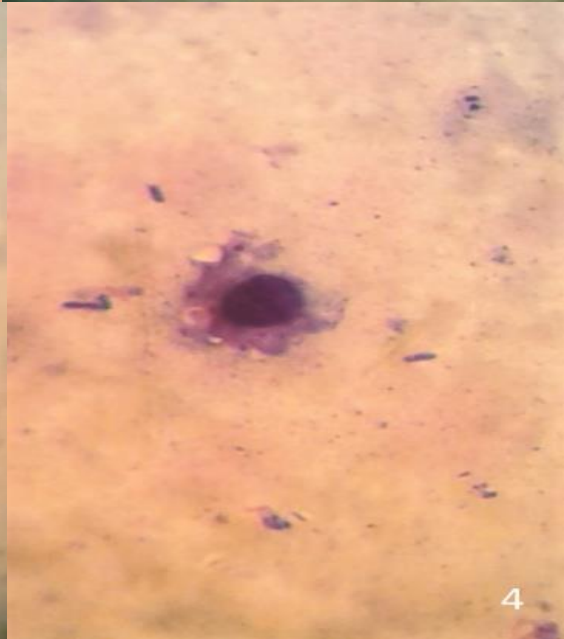
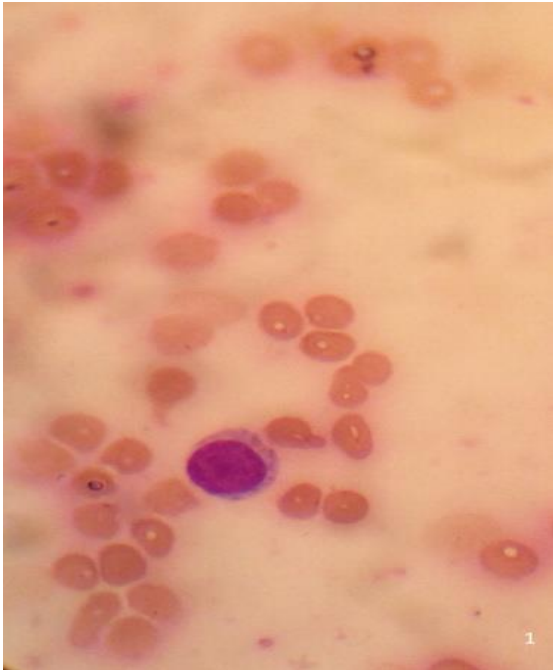
При стимуляції БАР МП бласти мали недостатньо розвинену цитоплазму та знижену її базофільність, як результат недостатнього розвитку білок-синтетичної системи.

У культурах в які додавалися БАР МП, стимульовані лімфоцити мали признаки апоптозу. В таких культурах зустрічалися некротичні лімфоцити у вигляді дифузних еозинофільних плям (рис. 4.4). Апоптоз та некроз лімфоцитів може свідчити про протизапальну дію БАР МП [2, 280].

**Таблиця 4.6. Показники реакції бластної трансформації лімфоцитів крові самиць та їхнього приплоду після гірудологічного впливу**

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

Примітки: СП – спонтанна РБТЛ (контроль), РБТЛ з лектином КонА, \* -  $p < 0,05$  показники, що достовірно відрізняються від СП, <sup>#</sup>-  $p < 0,05$  показники, що достовірно відрізняються від контрольної групи [280].



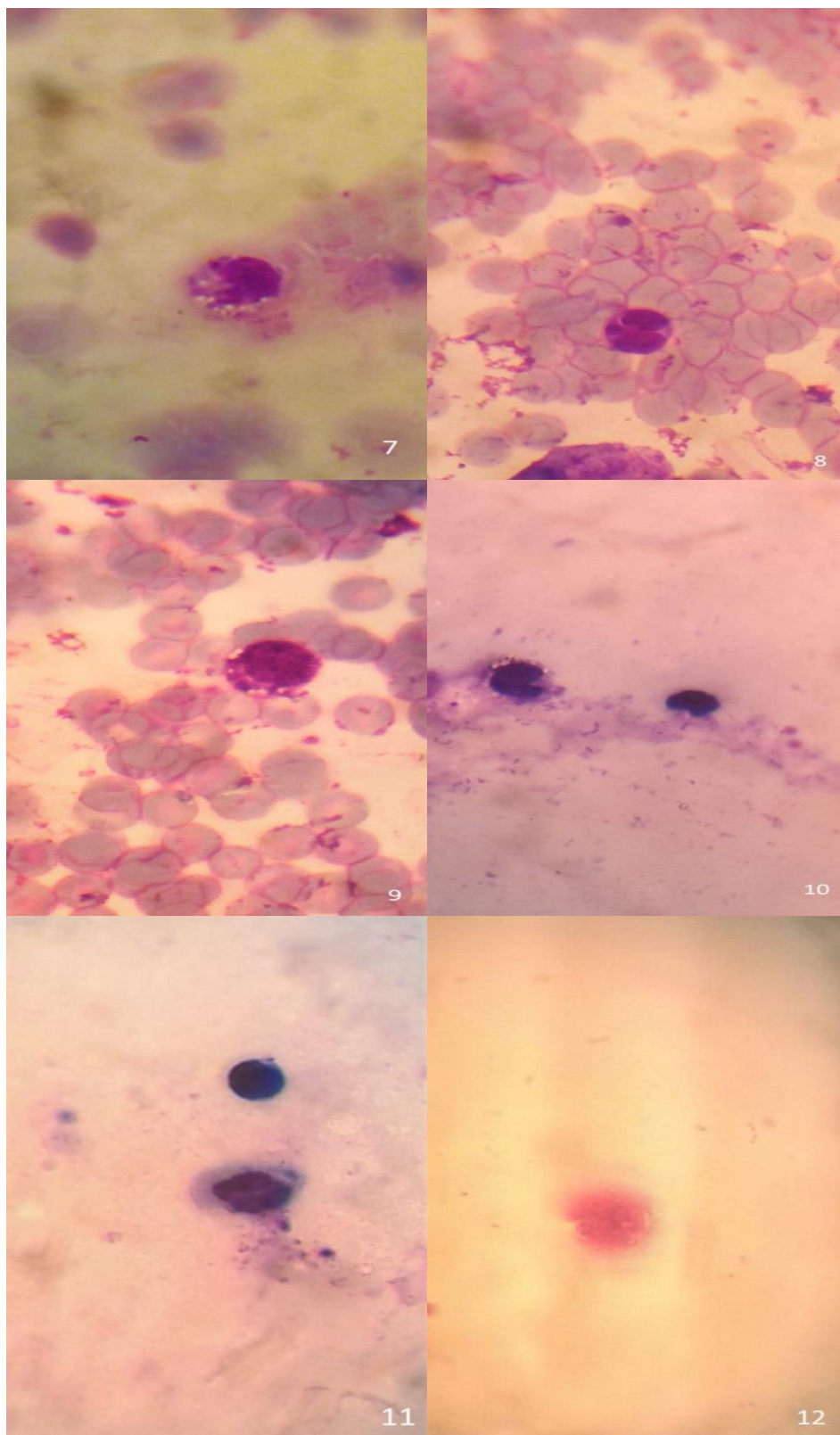


Рис. 4.4. Морфологічні форми бласттрансформованих лімфоцитів під впливом рослинного мітогену та БАР МП *Hirudo verbana* (об'єктив 100×, забарвлення за Романовським-Гімзою). Типові бласттрансформовані лімфоцити під впливом: 1) КоНА. Бласттрансформовані лімфоцити під впливом БАР МП *Hirudo verbana* із 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 [280].

## Мітотичний індекс кісткового мозку самиць щурів та їхнього приплоду

Для характеристики активності гемопоезу визначалася проліферативна активність КМ (рис. 4.5). У КМ серед різних стадій клітин диференціації знаходяться зазвичай проліферуючі клітини [2, 284]. Чим молодші елементи еритропоезу та лейкопоезу, тим вище їх МІ.

Величина МІ характеризує функціональну активність КМ. Збільшення або зменшення МІ може свідчити про порушення морфофункціонального стану первинного органу імунної системи КМ.

Порушення у КМ призводять до порушень у складі периферичної крові та всього організму.

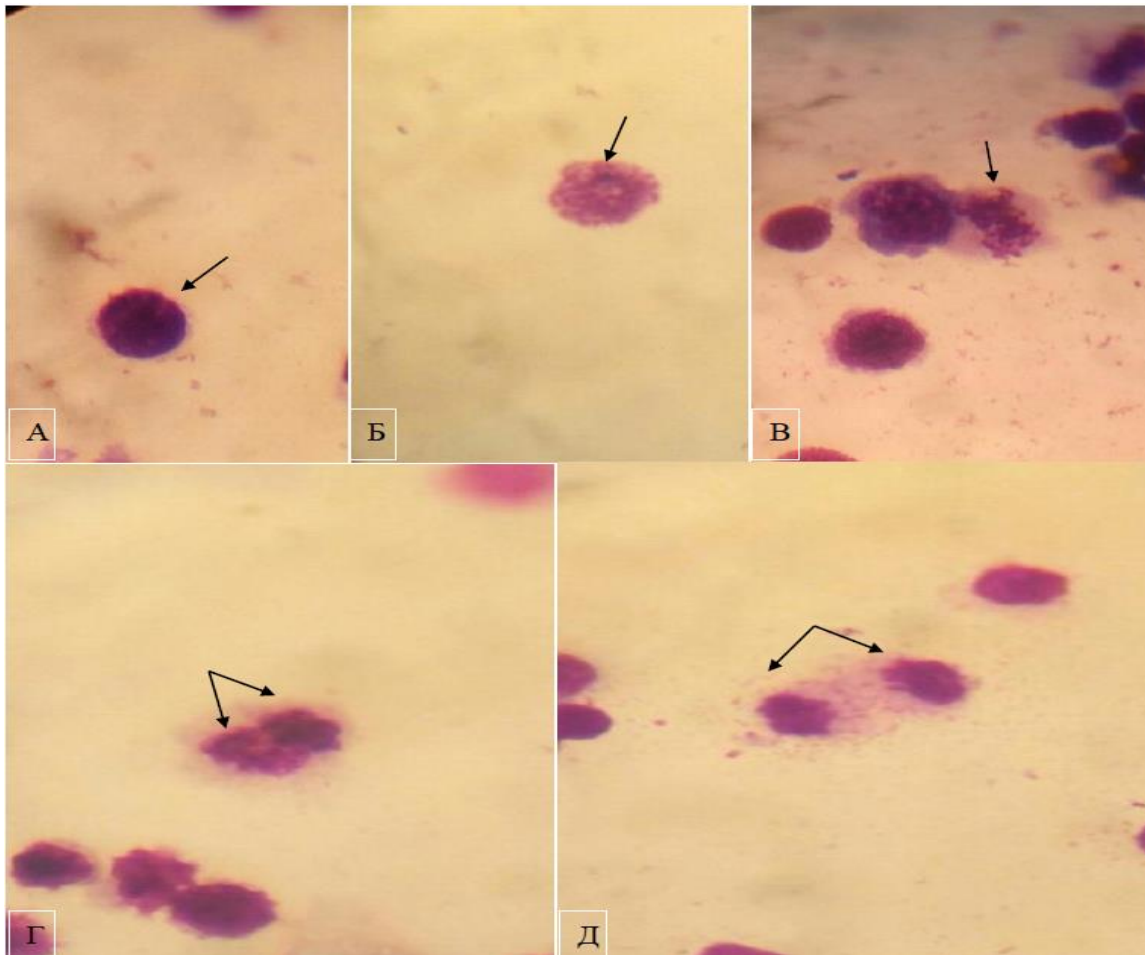
При дослідженні проліферативної активності клітин КМ відмічалася збільшення МІ у самиць та їхнього приплоду на всіх термінах спостереження (табл. 4.7) [2].

**Таблиця 4.7. Мітотична активність кісткового мозку самиць щурів та їхнього приплоду після гірудологічного впливу, ‰**

Група тварин	Контроль	Гірудовплив
Самиці	14,84 ± 0,32	22,24 ± 1,06
Приплід		
1 – доба	14,33 ± 0,30	28,90 ± 0,44
15 – доба	15,09 ± 1,14	21,53 ± 1,16*
30 – доба	9,17 ± 0,48	16,23 ± 1,26
45 – доба	9,05 ± 0,53	14,16 ± 0,16 *
60 – доба	10,96 ± 0,54	14,38 ± 0,43

Примітка: \* -  $p < 0,05$  порівняно із контрольною групою [2, 272].

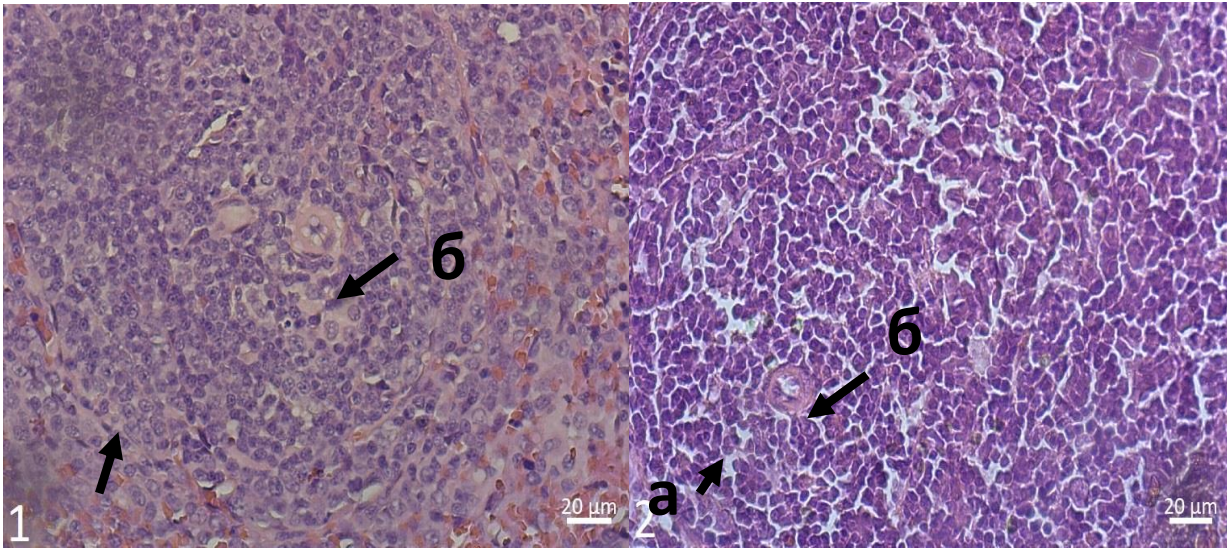
У дослідної групи самиць МІ підвищувався на 32,6 % порівняно з контрольною групою тварин. У приплоду максимально МІ підвищувався на першу добу (на 50,9%), порівняно с контрольною групою тварин (табл. 4.7). У інші терміни спостереження: на 15 добу (на 29,1 %) та 45 добу (на 32,2 %) ( $p < 0,05$ ), відмічалася тенденція до збільшення на 30 добу (на 42,0 %) та на 60 добу (на 25,2 %) порівняно з контрольною групою тварин (табл. 4.7) [2].



**Рис. 4.5.** Стадії мітозу: а – інтерфаза, б - профаза, в – метафаза, г - анафаза, д – телофаза (чорними стрілками помічена клітина у стадії мітозу); довжина бара – 10 мкм; забарвлення за методом Романовського-Гімза [272].

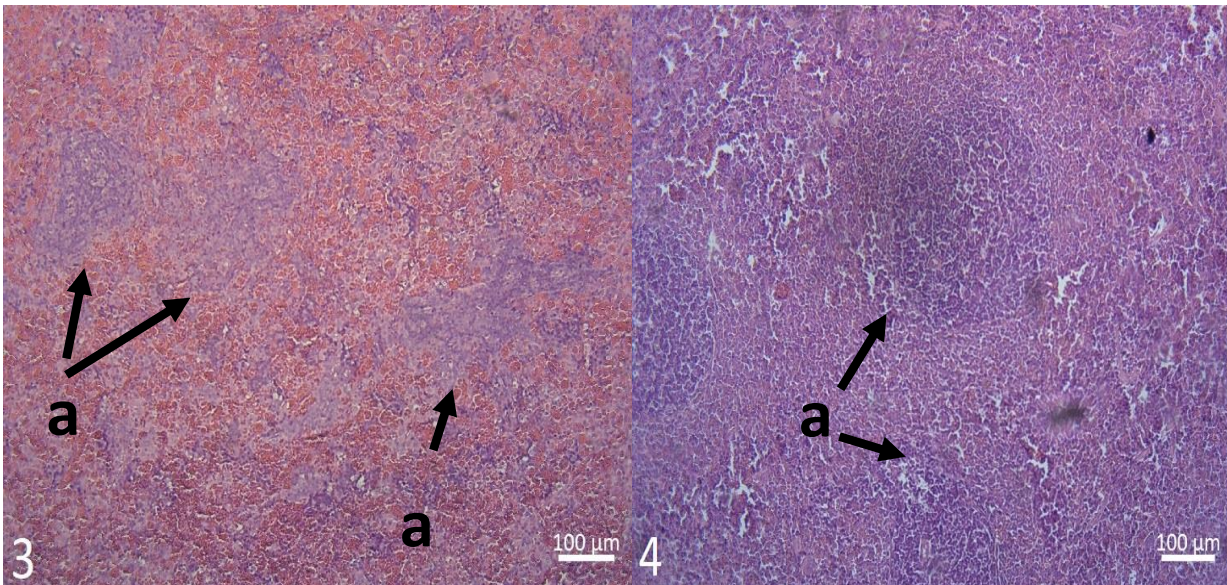
### **Цитоморфологічні показники селезінки та тимусу самиць щурів та їхнього приплоду**

У білій пульпі селезінки у самиць збільшувалася площа (на 23,22 %) та кількість лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм<sup>2</sup>) (на 18,86 %) ЛФ, збільшувалася площа (на 16,41 %), діаметр (на 8,66 %) та товщина (на 34,54 %) ЦА (табл. 4.8 та 4.9, рис. 4.6).



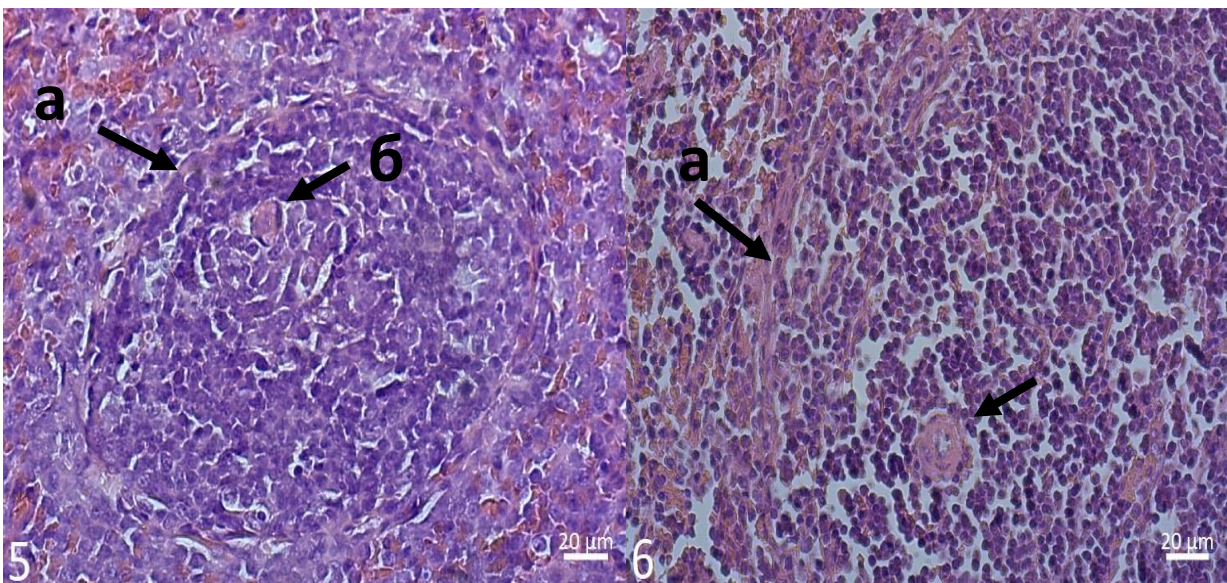
1 – Контроль 45 доба ЛФ

2 – Гірудовплив 45 доба ЛФ



3 – Контроль 45 доба селезінка

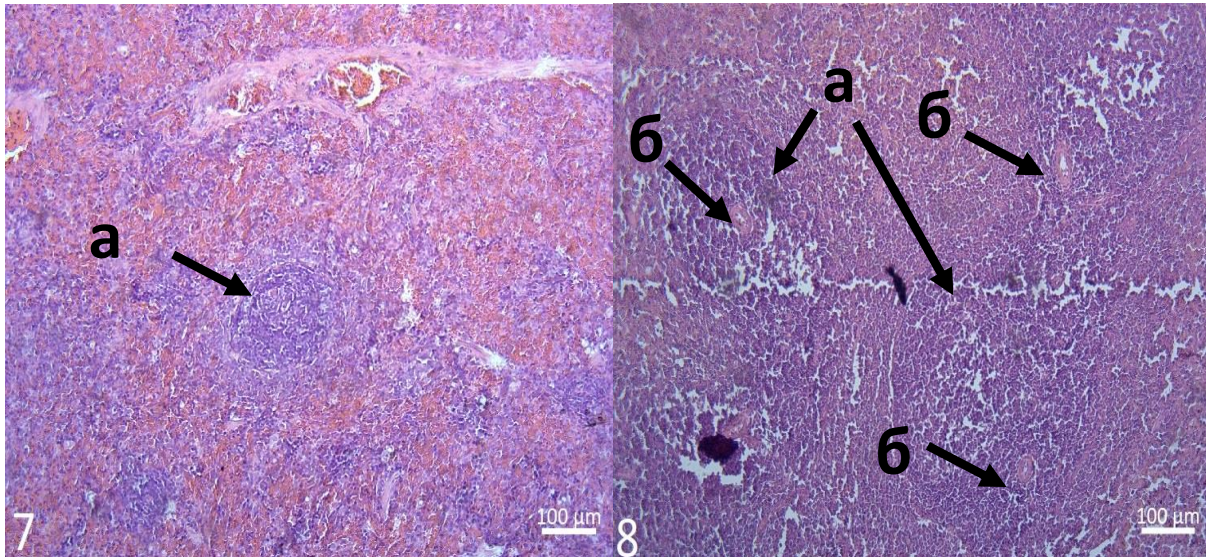
4 – Гірудовплив 45 доба селезінка



5 – Контроль 60 доба ЛФ

6 – Гірудовплив 60 доба ЛФ





7 – Контроль 60 доба селезінка

8 – Гірудовплив 60 доба селезінка

**Рис. 4.6.** Гістологічний препарат селезінки приплоду самиць щурів, котрі зазнали гірудологічного впливу (1, 2, 5, 6 збільшення – х 600, 3, 4, 7, 8 – х100) [2].

Примітка: а – лімфоїдний фолікул, б – артерія, ЛФ- лімфоїдний фолікул.

Такаж, тенденція до збільшення показників ЛФ відмічалася у їхнього приплоду: на 15 добу - площа (на 42,19%), діаметр (на 30,50%) ЛФ та кількість лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм<sup>2</sup>) (на 35,77%); на 30 добу - площа (на 19,44%), діаметр (на 15,31%) ЛФ та кількість лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм<sup>2</sup>) (на 48,25%); на 45 добу - площа (на 37,26%) та кількість лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм<sup>2</sup>) (на 32,47%); на 60 добу – площа (на 50,52%), діаметр (на 12,54%) та кількість лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм<sup>2</sup>) (на 41,25%) (табл.4.8). У ЛФ відмічалася тенденція до збільшення площі, довжини та товщини ЦА у самиць та їхнього приплоду на 15 та 60 добу (табл.4.9). Тимус самиць щурів зазнавав інволюції, а у тимусі приплоду, як в корковому, так і мозковому речовинах збільшувалася кількість клітин на одиницю площі, переважала коркова над мозковою речовиною тимусу, що свідчило про стимулюючий вплив БАР слини *Hirudo verbana* на лімфоїдні органи (селезінку та тимус) імунної системи. У корковій речовині тимусу приплоду збільшувалася кількість клітин на одиницю площі (400 мкм<sup>2</sup>) на 15 (17,00%), 30 (30,42%), 45 (20,35%) та 60 (36,72%) добу (рис. 4.7). У мозковій речовині збільшувалася кількість клітин на одиницю площі (400 мкм<sup>2</sup>) на 15 (6,64%), 30 (3,59%) та 45 (5,45%) добу (рис. 4.7) [2].

**Таблиця 4.8. Морфологічні показники лімфоїдних фолікулів білої пульпи селезінки самиць та їхнього приплуду після гірудологічного впливу**

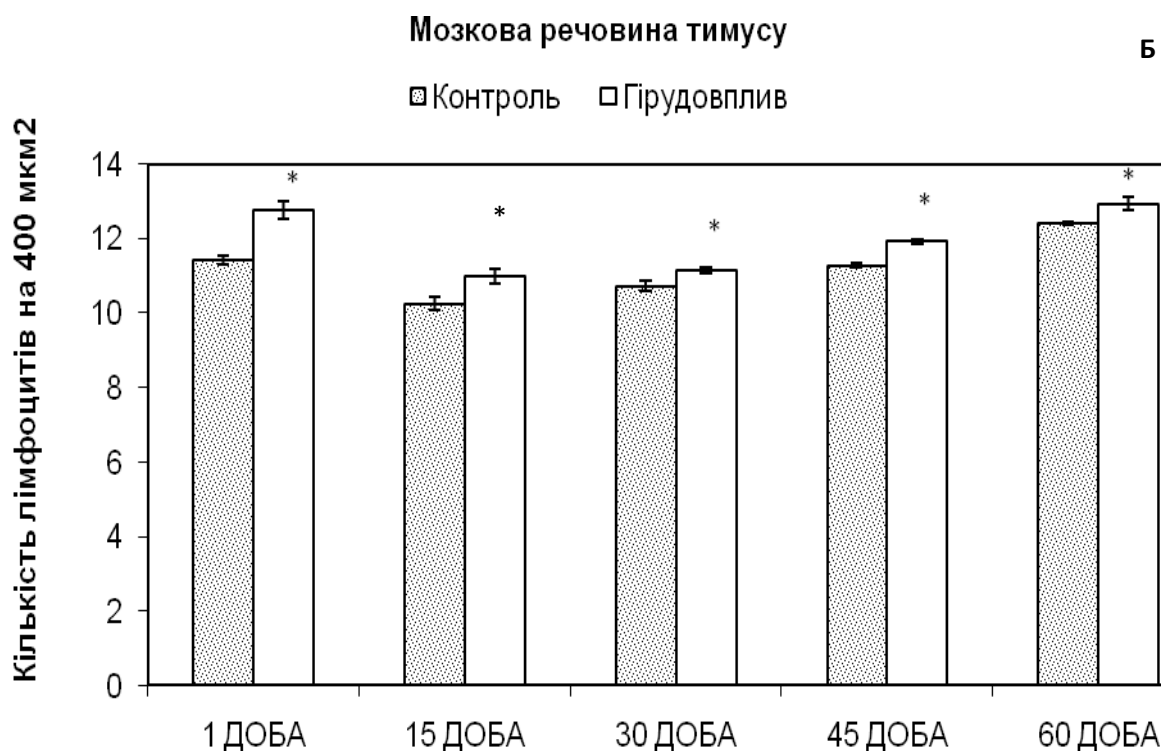
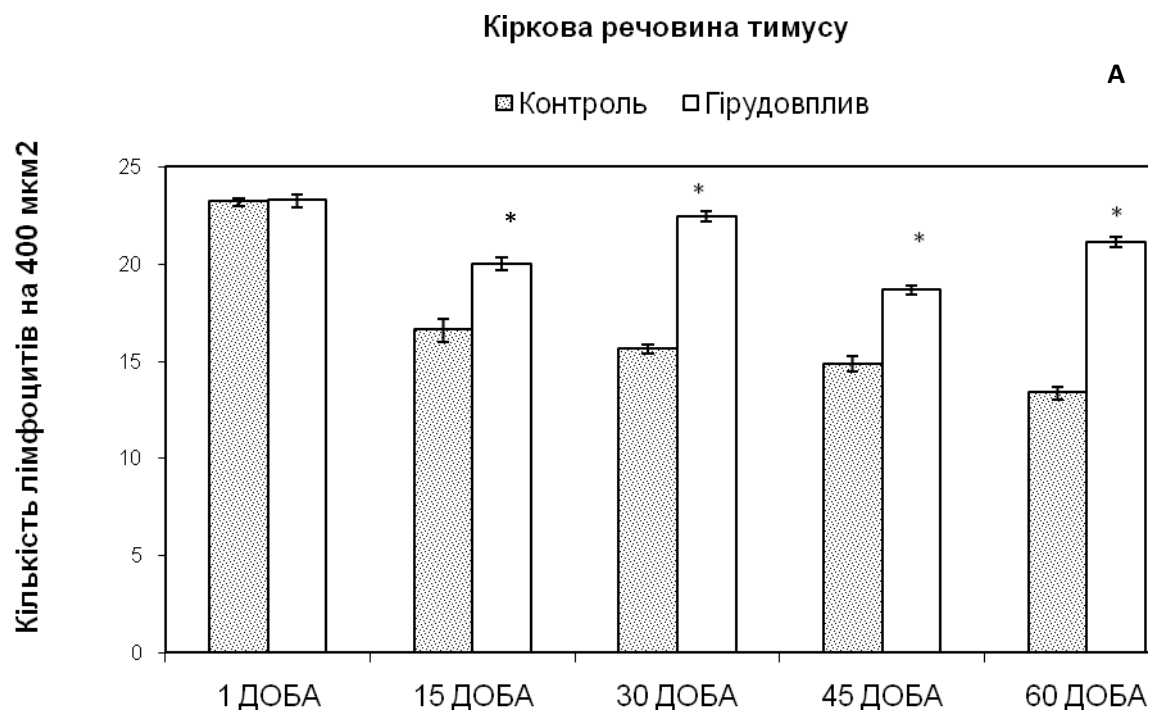
Група тварин		Лімфоїдний фолікул			
		Площа, мкм <sup>2</sup>	Діаметр мкм	Кількість лімфоцитів на 400 мкм <sup>2</sup> ЛФ	Кількість макрофагів на 400 мкм <sup>2</sup> ЛФ
Самиці	Контроль	15302,26±1353,87	137,80±15,85	16,09±0,54	відсутні
	Гірудовплив	19931,14±1021,60*	116,97±14,4	19,83±0,59*	відсутні
Приплід					
1 - доба	Контроль	5550,39±785,11	75,85±0,82	7,73±0,78	відсутні
	Гірудовплив	5493,59±748,41	77,95±1,75	13,00±0,24*	відсутні
15 - доба	Контроль	18936,12±2033,77	154,83±14,10	10,97±0,30	0,22±0,05
	Гірудовплив	32758,2±3010,71*	222,78±13,21*	17,08±0,37*	0,21±0,05
30 - доба	Контроль	23293,00±1943,40	167,00±11,90	8,41±0,31	0,20±0,03
	Гірудовплив	28914,11±1731,33*	197,2±15,42*	16,25±0,25*	0,19±0,09
45 - доба	Контроль	52346,98±7780,70	275,27±37,60	12,29±0,27	відсутні
	Гірудовплив	83436,45±1152,02*	272,27±85	18,2±1,01*	відсутні
60 - доба	Контроль	35263,22±3292,03	238,20±12,30	11,32±0,84	0,58±0,13
	Гірудовплив	71264,01±2395,5*	272,35±11,82*	19,27±1,08*	0,56±1,8

Примітка: \* -  $p < 0,05$  порівняно із контрольною групою [2].

**Таблиця 4.9. Морфологічні показники центральних артерій лімфоїдних фолікулів білої пульпи селезінки самиць та їхнього приплуду після гірудологічного впливу**

Група тварин		Центральна артерія		
		Площа, мкм <sup>2</sup>	Діаметр мкм	Товщина мкм
Самиці	Контроль	831,46±65,88	27,12±1,16	9,42±0,60
	Гірудовплив	994,70±30,45*	29,69±1,87	14,39±2,85*
Приплід				
1 – доба	Контроль	373,51±9,32	21,36±2,56	5,50±2,00
	Гірудовплив	381,10±5,00	21,20±0,30	6,70±0,60
15 – доба	Контроль	819,65±170,80	29,81±3,23	10,22±1,62
	Гірудовплив	1656,89±334,59*	48,22±8,43*	16,04±2,48*
30 – доба	Контроль	479,50±83,94	23,02±2,20	7,72±0,31
	Гірудовплив	465,15±295,45	22,89±8,02	9,95±1,15*
45 – доба	Контроль	1314,23±484,50	36,98±6,21	11,57±1,12
	Гірудовплив	957,42±313,88	33,24±6	10,47±2,1
60 – доба	Контроль	817,98±286,57	30,64±5,03	5,65±0,87
	Гірудовплив	1955,5±409,78*	50,14±7,28*	19,87±3,31*

Примітка: \* -  $p < 0,05$  порівняно із контрольною групою [2].



**Рис. 4.7.** Кількість лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм<sup>2</sup>) речовин тимусу приплоду, які піддавалися гірудовпливу. А – коркова речовина, Б – мозкова речовина [2].

Примітка: \* -  $p < 0,05$  порівняно із контрольною групою.

## Кореляційний взаємозв'язок між показниками

Аналіз кореляційних взаємозв'язків між ваговими показниками тіла та лімфоїдних органів приплоду щурів, котрі зазнали ГВ у перикоїтальному періоді дає уявлення про взаємозв'язок між загальним морфогенезом та морфогенезом в імунній системі цих тварин. Отримані результати засвідчують позитивний вплив біологічно активних медіаторів МП, отриманих самицями, на загальний морфогенез та морфогенез лімфоїдних органів їхнього приплоду. У приплоду самиць дослідної групи спостерігалася гармонізація розвитку тимусу та селезінки, порівняно з новонародженими щурами контрольної групи, про що свідчать підвищені показники позитивного кореляційного взаємозв'язку між ваговими індексами цих органів (табл. 4.10) [2].

**Таблиця 4.10. Кореляція між показниками вагою тіла та вагою лімфоїдних органів самиць щурів та їхнього приплоду після гірудологічного впливу, г**

Показники	Група тварин	Самиці	1- доба	15- доба	30- доба	45- доба	60- доба
Вага тимусу – вага селезінки	Контроль	0,52*	-0,05	0,93*	-0,28	0,91*	0,94*
	Гірудовплив	-0,53*	0,93*	0,98*	-0,61*	0,19	0,29
Вага тіла – вага тимусу	Контроль	0,79*	-0,58	0,99*	0,97*	0,99*	0,95*
	Гірудовплив	0,88*	0,46*	0,73*	*0,90	0,91*	-0,35
Вага тіла – вага селезінки	Контроль	0,64*	0,12	0,95*	-0,30	0,96*	0,81*
	Гірудовплив	-0,67*	0,53*	0,83*	-0,32	0,45*	0,71*

Примітка: \* – достовірний кореляційний взаємозв'язок між показниками [2].

Достовірних відмінностей між показниками кореляційного взаємозв'язку між загальним ваговим показником та ваговими показниками аналізованих лімфоїдних органів у приплоду самиць контрольної та дослідної груп не виявлено. Слід відмітити втрату позитивного з одночасним формуванням помірного негативного кореляційного зв'язку між ваговими показниками лімфоїдних органів та між загальним ваговим показником і ваговим показником селезінки у самиць, що зазнали ГВ [2]. Слід відмітити, що такі позитивні зміни могли відбутися із-за поширення та введення БАР МП при ГВ.

БАР МП при ГВ поширюються в організмі тварин в основному лімфогенно та через периферичні кровоносні капіляри. При цьому МП при годуванні сама визначає опосередкованість введення їх БАР та їх дозування залежності від періоду акту смоктання: на початку і в середині - деструктивні та гемостатичні компоненти, у другій половині харчування – протизапальні, регенеруючі та стимулюючі компоненти.

### Узагальнення 3 та 4 розділів

В експериментах на лабораторних щурах у третьому та четвертому розділах було виявлено, що БАР водно-сольового екстракту та слини, яка потрапляє під час ГВ МП *Hirudo verbana*, у передкоїтальному та після коїтальному періодах, здатні стимулювати імунну систему статевозрілих самиць та їхнього приплоду в ранньому постембріональному онтогенезі. При аналізі дослідних груп тварин було встановлено, що БАР, які потрапляють під час гірудологічного впливу та введення водно-сольового екстракту МП, проявляють виражену морфогенетичну дію на самиць та їхній приплід в постембріональному онтогенезі. Ця дія зареєстрована на організменому, тканинному та клітинному рівнях [2]. Був показаний активний стимулюючий ефект на тканини внутрішнього середовища: гемопоетичну та лімфоїдну, структурною основою яких є ретикулярна тканина, що відноситься до спеціалізованої пухкої сполучної тканини, основні властивості якої: трофічна, захисна, регуляторна. Він проявлявся збільшення еритроцитарних (кількість еритроцитів, гемоглобін), лейкоцитарних (кількість лейкоцитів, функціональну активність нейтрофілів) показників крові, що в свою чергу впливало на ріст та розвиток фізичних параметрів тіла та лімфоїдних органів імунної системи (селезінки та тимусу) [2, 275, 280, 284]. Пролонгована стимуляція морфогенезу у дослідній групі щурів, окрім можливого депонування в тканинах залишкових кількостей БАР слини та водно-сольового екстракту МП, більш ймовірно, була обумовлена основною функцією імунної системи – морфогенетичною, яка контролює та регулює гістогенез усіх тканин [285, 286]. Приведений висновок

базується на експериментальних даних цих розділів [265-267, 272, 276] та літературних даних інших робіт [287, 276-278]. Під впливом БАР МП відбувалося збільшення ваги щурів у дослідній групі тварин, морфологічних параметрів тіла та лімфоїдних органів. Стимуляція БАР МП лімфоїдних органів забезпечувала збільшення кількісних та функціональних показників (еритроцитарних та лейкоцитарних) самиць та їхнього приплоду. Гемостатичний вплив БАР МП здійснювався у межах фізіологічних норм, на що вказувала онтогенетично збалансована лейкоцитарна формула крові в порівнянні з контрольними групами, а також відсутність тератогенних ознак. На морфогенетичну, або ремодулюючу [2, 277, 286] функцію імунної системи вказують дані літератури про периферичну інфільтрацію лейкоцитами, зокрема популяціями та субпопуляціями лімфоцитів, у жінок в процесі оваріального циклу [281]. Широке обговорення отримала також, гіпотеза Бабаєвої та її школи, щодо морфогенетичної функції імунної системи, яка опосередкована в основному з активністю Т - та В - лімфоцитів. Автори продемонстрували, що індукція репаративної регенерації всій складності тканинної архітекtonіки органів, наприклад печінки, у інтактних тварин при адаптивному переносі їм аутоклонів Т - і В - лімфоцитів від дослідних щурів на тлі репаративної регенерації органів після операційної їх резекції [2, 282]. При цьому міграційна інфільтрація лімфоцитів передувала активним регенераційним процесам у оперованих органах. Більш того, блокування певних стадій гістогенезу в печінці щурів та при адаптивному перенесенні від їх лімфоцитів інтактним тваринам стимулювало у останніх продовження гістогенезу, саме із заблокованої стадії. Було зроблено припущення про наявність наборів аутоклонів Т - та В - лімфоцитів до стадіоспецифічних та кінцевих диференційованих структурам, які контролюють гістогенетичні та морфогенетичні реакції в організмі тварини, в тому числі і у людини [283]. Таким чином, імуноцити окрім захисних імунних реакцій, виконують морфогенетичну функцію, яка забезпечують гістогенез та репарацію будь-якого відновлювального росту, як одна із фундаментальних властивостей лімфоїдних

клітин. Участь морфогенетичної функції у фізіологічних і репаративних гістогенезах підтверджується також, даними відомих імуноморфологів [2, 282], які виявили, що при різних функціональних навантаженнях на орган, або при порушенні в ньому структурного гомеостазу інфекційними та не інфекційними факторами відбувається інфільтрація даного органу лейкоцитами, зокрема популяціями Т - та В - лімфоцитами [2, 282, 283].

Особливість онтогенетичних параметрів пулу активованих Т - і В - лімфоцитів у периферичній крові людей, також свідчить про наявність морфогенетичної функції імунної системи [288]. Так, у дітей до пубертатного періоду кількість активованих лімфоцитів у периферичній крові, які зберігають ознаки попереднього лімфогенезу та імуногенезу коливалися в межах 35-50 %, тоді як у дорослих (середнього віку), у яких завершений ріст та розвиток організму, кількість таких лімфоцитів коливалася в межах 20-35 % та підтримувався відносно на постійному онтогенетичному рівні навіть в ізольованих зразках крові після екстримальної холодової інкубації при 4°C [2, 289]. Окрім того, всі численні дані літератури про ремодуляцію фізіологічної та репаративної регенерації під впливом ГТ, та її імунологічні ефекти, також вносять певний внесок у доведення морфогенетичної функції імунної системи [2, 285-289]. Отримані експериментальні результати цих розділів, також збігаються з даними про морфофізіологічні зміни у кіз після курсів гірудологічних приставок. Так, в період роздоювання у тварин підвищувалася вага тіла, збільшувалася молочність без ускладнення маститом, а в репродуктивний період відзначалося 100% запліднення, народження двійнят зі збільшеною вагою в порівнянні з контрольною групою тварин [2, 8, 151]. На коровах, гірудопунктура сприяла прискореній післяпологовій реабілітації, зворотній інволюції репродуктивних органів до фізіологічного стану [2, 152, 160-165].

Морфогенетична функція імунної системи логічно впливає з даних численних авторів про наявність аутоантитіл та аутоенсибілізованих Т - і В -лімфоцитів до будь-яких структур клітин та тканин [2, 290]. Згідно їх даних

усі новостворені Т - та В - лімфоцити є помірними аутоклонами до будь-яких структур клітин та тканин. На цьому припущені А. Б. Полетаєв (2010 р.) та його послідовники висунули гіпотезу про «Імункулос» - наявність набору циркулюючих аутоантитіл, що відображають структурну організацію організму [290]. Дана гіпотеза є гомологічною до «Гомункулосу» - рецепторна організацією ЦНС, тестуюча стан організму. Експериментальні дослідження проведені Полетаєвим А. Б. за допомогою системних змін структури сукупності аутоантитіл різної специфічності формує динамічний процес, що відображає особливості молекулярного складу нашого тіла, таким чином, імунна система виявляє здатність відображати органі, тканинні та загальноорганізмені функціонально-метаболічні перебудови, в тому числі, що мають діагностичне та прогностичне значення [2].

Отримані вище наведені результати збігаються, також із іншими даними провідних науковців, щодо участі в регуляції регенераційного процесу різних елементів імунної системи: лімфоцитів, макрофагів, нейтрофілів, тучних клітин, еозінофілів. Так, при стимуляції клітин Купфера хід регенерації гепатоцитів прискорюється, а при гальмуванні їх поглинальної здатності до часткової резекції печінки або в перші години після неї сповільнюється [2, 291]. Передбачається, що незабаром після часткової гепатектомії купферовські клітини починають виділяти в мікросередовище фактори, що стимулюють проліферацію гепатоцитів [291]. На моделях часткової гепатектомії та крововтрати було встановлено, що в регуляції відновлювальних процесів особливу роль відіграють макрофаги. Для різних механізмів відновного процесу (клітинних або внутрішньоклітинних) необхідні різні елементи імунної системи. Так, активація Т - лімфоцитів стимулює внутрішньоклітинні процеси регенерації, а макрофаги – клітинні [2, 278]. На участь нейтрофілів в регуляції регенераційного процесу вказують дослідження І. І. Долгушина та О. В. Бухаріна [277], які на моделі адаптивного перенесення показали, що перитонеальні нейтрофіли інтактних мишей F1 при трансплантації сингенним тваринам зі стандартною опіковою травмою помітно прискорюють епітелізацію



рани. Цей стимулюючий ефект автори пов'язували з секретуючими нейтрофілами низькомолекулярними пептидами. Тучні клітини беруть же участь в регенераційному процесі, викликаючи фіброз тканини, пригнічуючи проліферацію фібробластів та посилюють їх диференціювання, а також синтез колагену. Вони виділяють фактори росту нових капілярів, беруть участь в ангиогенезі, виділяють фактори, що привертають лімфоцити, нейтрофіли, макрофаги, тромбоцити, моноцити та еозинофіли. Таким чином, в даний час вже показано, що різні елементи імунної системи беруть участь в регуляції регенераційного процесу. У цих розділах описуються також, встановлений позитивний вплив БАР слини та водно-сольового екстракту МП на ФАН. З літературних даних відомо, що зниження ФАН веде до хронізації запального процесу та сприяє підтримці алергії та аутоалергії. Підвищення показників ФАН при ГВ пов'язано з активацією вродженого імунітету під впливом БАР МП, і відповідає іншим науковим даним [1, 2, 8, 12]. При аналізі оксидативного метаболізму нейтрофілів у самиць щурів та їхнього приплоду за впливу слини та сольового екстракту БАР МП достовірно збільшувалися НСТ - спонтанний та НСТ – стимульований тести порівняно з контрольною групою тварин. Такі зміни у показниках ФАН крові щурів можуть бути пов'язані з активацією вродженого імунітету під впливом комплексу БАР МП [1, 12].

Лімфоцити *in vitro* у культурі з цільною кров'ю щурів стимульованих рослинним мітогеном та БАР МП водно-сольового екстракту із тіл МП, проявляли активаційні та проліферативні потенції лімфоцитів. У добових мітогенстимульованих (КонА) культурах лімфоцитів щурів до ГВ спостерігалася проліферативна реакція у вигляді бластів, рівні якої відповідали імунному потенціалу даного віку, а також природі відповідного мітогену. Подібна реакція, але з підвищенням її рівня спостерігалася і після ГВ [2]. Порівняно з рослинним мітогеном БАР МП стимулювали непродуктивний імуногенез, який виражався появою лімфоцитів із морфологічними ознаками апоптозу та некрозу, що, ймовірно, і був їх провідним механізмом протизапальної дії. Збільшення рівня РБТЛ вище спонтанного під впливом БАР

МП у тварин, які раніше не контактували з ними, можна пояснити наявністю загальних участків (патернів) у білковій організації усіх видів. За сучасними уявленнями структурні патерни [2, 292] являють собою філогенетично стабільні, обмежені 10 – 20 мономерами послідовності біополімерів (ФСПБ) подібні у представників різних філогенетичних груп. Видова різноманітність молекулярних патернів також обмежена близько 20 [293]. З цих позицій отримує логічне пояснення також факт підвищення РБТЛ після ГВ, як результат збільшення в рециркуляції сенсibiliзованих до БАР аптечної МП лімфоцитів, які мають спільні патерни з іншими видами. Перевищення РБТЛ на БАР МП порівняно із спонтанними культурами навіть у контрольній групі самиць, можна пояснити поліклональністю цих БАР, а досягнення РБТЛ на БАР МП рівня поліклонального активатора лімфоцитів Кон А у дослідній групі самиць, підтверджує гетерофільність патернів усіх форм клітинного Життя. При цьому, якщо врахувати, що стимулюючі лімфоцити на БАР МП проявляли ознаки апоптозу та некрозу, то запрограмована смерть імунокомпетентних клітин є філогенетичним завданням МП, як абсолютного гемофага – пригнічити імунологічну реакцію з'їденої крові. Даний факт також був відзначений у культурі лімфоцитів людини на БАР МП [2, 294]. Виявлені значно низькі показники РБТЛ в культурі лімфоцитів крові у приплоду порівняно із дорослими самицями, як у контрольній, так і у дослідній групі тварин, свідчило про відомий факт, щодо імунологічної незрілості цих клітин на даному онтогенезі у щурів. При аналізі кореляційних зв'язків була виявлена середня та сильна кореляція між вагою тимусу (первинного органу імунної системи) та вагою селезінки (вторинного органу імунної системи) із вагою тіла тварин [2]. Даний факт підтверджує пряму участь імунітету в зростанні та розвитку організму щурів, у його фізіологічній регенерації клітин, тканин та органів. При цьому імуотропний ефект БАР МП сприяв перш за все стимуляції розвитку органів імунної системи, що як правило підсилювало кореляційну залежність. Активуючи морфогенетичні реакції у дослідних тварин призводить, також до збільшення поліморфізму аналізованих ознак, що у ряді випадків знижує

кореляційний зв'язок, або навіть змінює його на негативний. Також, були виявлені деякі відмінності в стимулюючому ефекті БАР слини, яка виділялася при гірудологічному впливі та при введенні водно-сольового екстракту отриманого із тканин МП [2]. У першому випадку помітно переважав вплив тимічних порівняно з селезінковими факторами, тоді як в іншому випадку їх активність частіше зрівнювалися. Дана особливість впливу БАР МП на імунну систему, ймовірно, залежала від способу їхнього поширення в організмі дослідних тварин, так при ГВ БАР МП розповсюджуються переважно лімфогенно, а при внутрішньочеревному введенні БАР водно-сольового екстракту їх компоненти в більшості попадають в кров, а далі в селезінку, як дренальний орган за більшістю своєї функції [2]. Отримані результати збігаються про філоонтогенетичний зв'язок імунологічних реакцій: фактори вродженого імунітету ініціюють імунологічні реакції адаптивного імунітету. При цьому всі експериментальні дослідження проведені багатьма дослідниками про роль імунної системи в підтриманні морфогенезу також, підтверджуються дослідниками цих розділів [2].

## РОЗДІЛ 5. ІМУННА СИСТЕМА ТА РЕПРОДУКТИВНА ФУНКЦІЯ САМЦІВ ЩУРІВ НА ФОНІ ГІРУДОЛОГІЧНОГО ВПЛИВУ

Експериментальні дослідження цього розділу були присвячені вивченню дії ГВ МП виду *Hirudo verbana* на самців-щурів, а саме: на їх кількісні та функціональні показники сперматозоїдів у еякуляті; морфометричні показники тіла; морфометричні показники центрального (тимусу) та периферичного (селезінки) лімфоїдних органів, морфологічні та цитологічні їх показники.

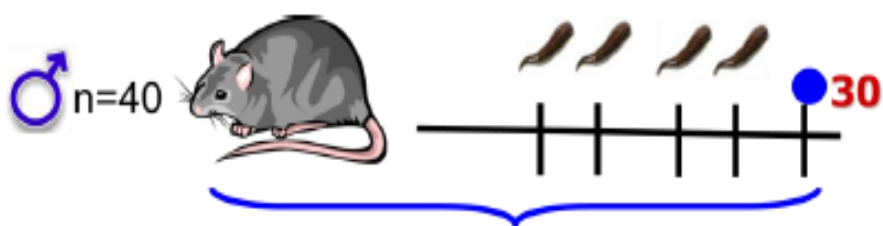
### Схема експериментальних досліджень

В експеримент було взято 40 нелінійних лабораторних білих щурів-самців.

Тварини були розподілені з використанням принципу рандомізації на 2 групи, кожна з яких містила по 20 щурів-самців рис. 5.1:


1) контрольна група щурів-самців, яких піддавали тільки короткочасному фіксуванню у станку.

2) дослідна група щурів-самців, яких піддавали короткочасному фіксуванню у станку для приставки на куприкову ділянку МП *Hirudo verbana*, один раз на тиждень, чотри рази. Самців виводили з дослідів через місяць спостережень, шляхом дислокації шийних хребців із наступною декапітацією. Визначався фізіологічний стан тварини за морфометричними показниками, зокрема дослідженням ваги тіла та основних лімфоїдних органів (селезінки та тимусу), аналізом репродуктивної функції самців: вага надсім'яників, загальна кількість сперматозоїдів, фертильність сперматозоїдів, морфологічні дослідження сперматозоїдів [295].



### Дослідження:

- вагових показників тіла;
- вагових показників та цитоморфологічних характеристик лімфоїдних органів;
- вагових показників надсім'яників;
- загальної кількості сперматозоїдів та їх фертильності;
- дефектних сперматозоїдів.

 часова точка збору біологічного матеріалу у самців


 гірудологічний вплив

Рис. 5.1. Схема проведених експериментальних досліджень

## Вага тіла та лімфоїдних органів

Під час аналізу ваги тіла та лімфоїдних органів у дослідної групи самців було зареєстроване їх збільшення порівняно з контрольною групою тварин ( $p < 0,05$ ) (табл. 5.1) [295]. Вага тіла збільшувалася в середньому на 17 %, вага тимусу на 23 %, а селезінки на 11,5 %.

Таблиця 5.1. Вага тіла та лімфоїдних органів самців після гірудологічного впливу

Група тварин	Вага тіла, г	Вага тимусу, мг	Вага селезінки, мг
Контроль	246,2±11,2	209,6±10,4	865,8±13,1
Гірудовплив	296,1±12,1*	272,1±11,1*	978,1±12,0*

Примітка: \* - показники, що достовірно відрізняються від контролю ( $p \leq 0,05$ ).

## Вага надсім'яників, загальна кількість сперматозоїдів їх морфологія та фертильність у еякуляті

У експериментальній групі тварин, яким робилися приставки МП (рис. 5.2), було виявлене значне збільшення ваги надсім'яників (на 24,6 %) порівняно з контрольною групою тварин  $p < 0,05$  (табл. 5.2).



Рис. 5.2. Приставка медичної п'явки [295].

Під час дослідження еякуляту із надсім'яників, загальна кількість сперматозоїдів в 1 мкл еякуляту у експериментальній групі тварин різко зростала майже в 2 рази (на 42,2 %) порівняно з контрольною групою тварин (табл. 5.2 та рис. 5.3) ( $p < 0,05$ ) [295, 296].

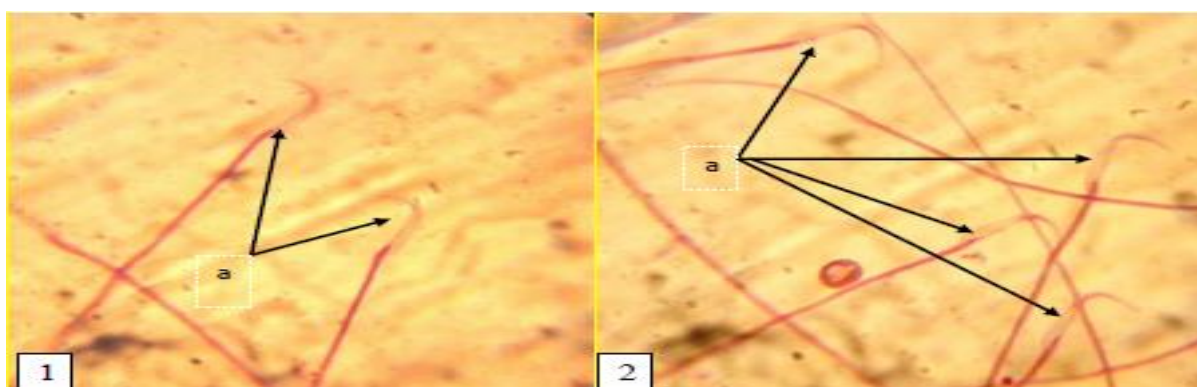


Рис. 5.3. Сперматозоїди самців-щурів (а): 1-контроль; 2 – під гірудологічним впливом.

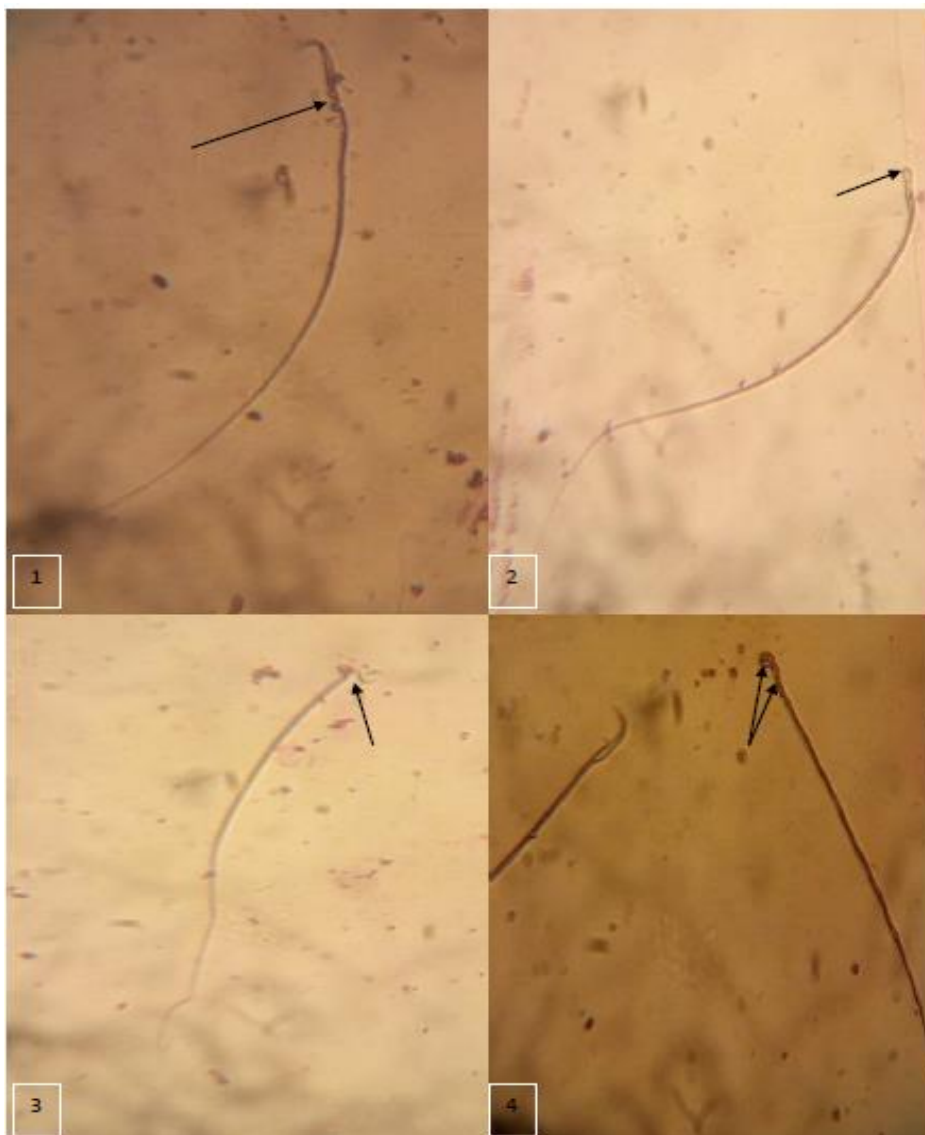
Фертильність сперматозоїдів у експериментальній групі тварин також різко зростала (в середньому на 75 %)  $p < 0,05$ . При морфологічному аналізі

сперматозоїдів в мазку у експериментальній групі тварин зустрічалося набагато менше дефектних сперматозоїдів (на 57,4 %) ніж у контрольній (табл. 5.2 та рис. 5.4), що може свідчити про позитивні відновлюючі ефекти від БАР МП [295].

**Таблиця 5.2. Вага надсім'яників самців після гірудологічного впливу**

Група тварин	Вага надсім'яників, мг	Загальна кількість сперматозоїдів в 1 мкл 5 мл суспензії еякуляту	Фертильність сперматозоїдів в 1 мкл 5 мл суспензії еякуляту	Дефектні сперматозоїди на 200 клітин (шт.)
Контроль	511±23	5750±287	300±14	47,0±4,0
Гірудовплив	678±31,7*	9950±497*	1200±59*	20,0±3,0*

Примітка: \* - показники, що достовірно відрізняються від контролю ( $p \leq 0,05$ ).



**Рис. 5.4. Найбільш поширені дефекти сперматозоїдів позначені чорними стрілками: 1-шийний дефект; 2,3-головний дефект; 4 –дефект голови та шийки сперматозоїда [295].**

## **Цитоморфологічні показники селезінки та тимусу статевозрілих самців щурів**

При аналізі ЛФ селезінки в дослідній групі тварин, переважала біла пульпа порівняно з контрольною групою тварин [297] (рис. 5.5 та рис. 5.6).

У результаті дослідження кількості лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм<sup>2</sup>) у білій пульпі селезінки було зареєстровано достовірне збільшення лімфоцитів (на 24,4 %) порівняно з контрольною групою тварин ( $p < 0,05$ ; табл. 5.3) [297].

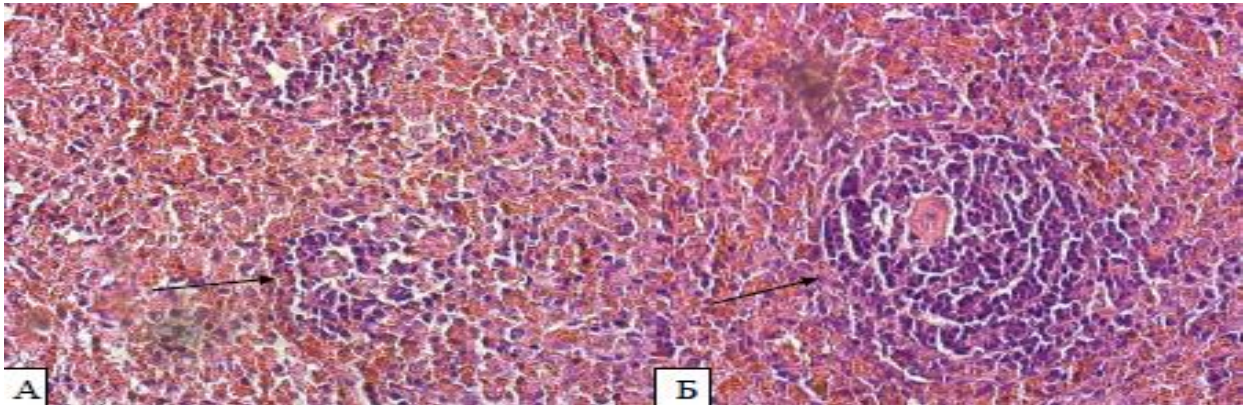
Також, зафіксовано збільшення площі (на 27,2%) та діаметру (на 12,3 %) ЛФ в дослідній групі порівняно з контрольною ( $p < 0,05$ ; табл. 5.3). В дослідній групі виявлено збільшення діаметру та товщини ЦА, а також збільшення площі періартеріальної зони (на 16,4 %) за рахунок можливого посилення лімфоїдної інфільтрації, що свідчило про активацію диференціювання Т - клітинного пулу лімфоцитів (табл. 5.3) [297]. Ці результати підтверджуються іншими науковими роботами. Наприклад, використання імунофану призводить до збільшення відносної площі білої пульпи [298]. У потомства самок лабораторних щурів, яким уводився імунофан, спостерігалася активація кровотворення та підвищення МІ в селезінці, збільшення кількості судинних компонентів [298].

При аналізі морфології будови центрального лімфоїдного органу – тимусу у самців щурів контрольної групи спостерігалася фізіологічна його інволюція, порівняно з дослідною в якій повністю відновлювалася гістологічна структура органу (рис. 5.7) [297]. Він виглядав, як повноцінний орган імунної системи, що може свідчити про імуномодулюючу властивість ГВ, який здатен завдяки впливу на морфогенетичну функцію імунної системи стимулювати функціональне відновлення лімфоїдного органу. Це припущення також підтверджувалося аналізом співвідношення речовин тимусу (табл. 5.3).

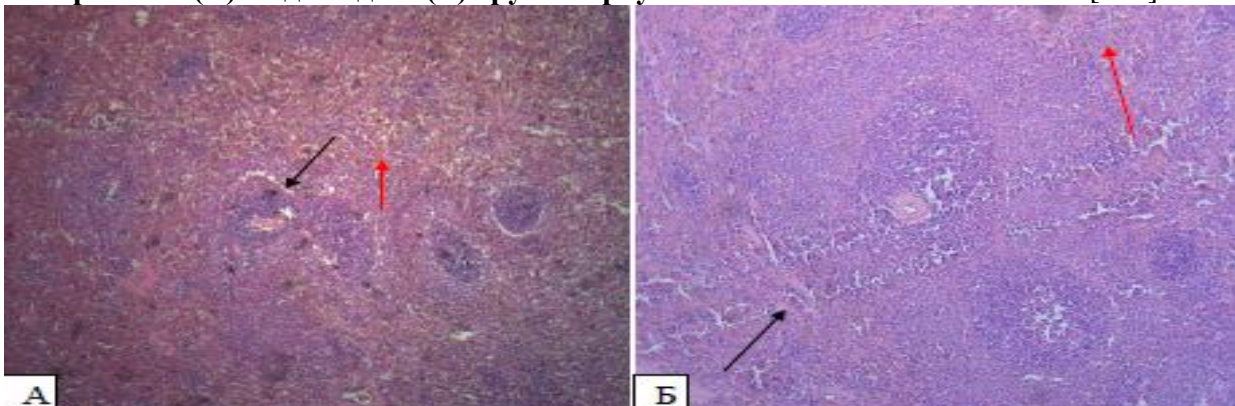
Відбувалося переважання коркової речовини над мозковою. Також слід відмітити, що у корковій (на 15,8 %) та мозковій (на 38,4 %) речовинах дослідної групи порівняно з контрольною групою, збільшується кількість



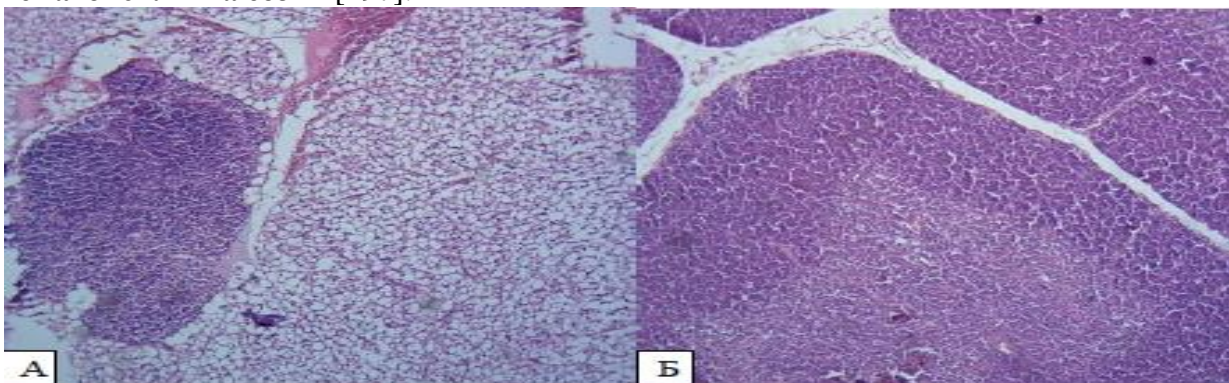
лімфоїдних клітин на одиницю площі ( $p < 0,05$ ) (табл. 5.4) [297], що може свідчити про імуностимулюючу дію ГВ на розвиток лімфоїдних органів. Отримані результати узгоджуються з результатами інших дослідників, які при застосуванні «Імунофану» у лабораторних щурів також спостерігали переважання коркової речовини за рахунок зменшення мозкової речовини та збільшення загальної кількості лімфоцитів у тимусі [298].



**Рис. 5.5.** Лімфоїдний фолікул білої пульпи селезінки самців лабораторних щурів контрольної (А) та дослідної (Б) груп. Фарбування: гематоксилін та еозин [297].



**Рис. 5.6.** Біла (чорна стрілка) та червона (червона стрілка) пульпа селезінки самців лабораторних щурів контрольної (А) та дослідної (Б) груп. Фарбування: гематоксилін та еозин [297].



**Рис. 5.7.** Тимус самців лабораторних щурів контрольної (А) та дослідної (Б) груп. Фарбування: гематоксилін та еозин [297].

**Таблиця 5.3. Зміни лімфоїдних фолікулів селезінки самців щурів під впливом *Hirudo verbena***

Група тварин	Площа лімфоїдного фолікулу мкм <sup>2</sup>	Діаметр лімфоїдного фолікулу мкм	Кількість лімфоцитів у лімфоїдному фолікулі мкм <sup>2</sup>	Площа центральної артерії лімфоїдного фолікулу мкм <sup>2</sup>
Контроль	14507.1±1324.2	137.8±8.3	15.08±0.52	831.5±61.2
Гірудовплив	19931±1455.2*	157.2±10.1*	19.83±0.63*	994.7±66.3*

Примітка: \* -  $p < 0,05$  у порівнянні з контрольною групою [297].

**Таблиця 5.4. Зміни кількості лімфоцитів у корковій та мозковій речовинах тимуса самців щурів під впливом *Hirudo verbena***

Група тварин	Кількість лімфоцитів у корковій речовині тимуса на 400 мкм <sup>2</sup>	Кількість лімфоцитів у мозковій речовині тимуса на 400 мкм <sup>2</sup>
Контроль	15.36±0.22	8.07±0.62
Гірудовплив	18.25±0.27*	13.11±0.44*

Примітка: \* -  $p < 0,05$  у порівнянні з контрольною групою [297].

### Узагальнення 5 розділу

Згідно експериментальним даним цього розділу під впливом БАР МП в дослідних самців щурів відбувалося збільшення ваги тіла та лімфоїдних органів (тимусу та селезінки). Ці дані підтверджуються результатами попередніх розділів. Де у самиць щурів також збільшувалася вага тіла та лімфоїдних органів (тимус та селезінка). Як уже було зазначено вище, схожу динаміку впливу БАР МП інші учені отримували у дослідах із малою рогатою худобою [151, 295]. Де спостерігалися позитивні морфологічні зсуви, які супроводжувалися адекватними змінами їх репродуктивної функції. Але, в експериментах цього розділу в дослідній групі самців щурів виявлене підвищення ваги надсім'яників, збільшення кількості сперматозоїдів, покращення їх морфологічних та фізіологічних властивостей. Цей факт виявлено вперше. Аналіз морфологічних показників сперматозоїдів у мазках експериментальної групи виявив меншу кількість морфологічно дефектних

сперматозоїдів, що може свідчити про відновлювальний ефект від ГВ. При цьому варто зазначити, що морфологічно дефектні сперматозоїди в більшості випадків унеможливають запліднення яйцеклітини. Тому зменшення дефектних сперматозоїдів за рахунок ГВ підвищує відсоток ймовірності запліднення [295]. Підвищення морфофізіологічних і репродуктивних властивостей у дослідних тварин має багатофакторні механізми. Насамперед, це зумовлюється комплексною дією самого ГВ: по-перше, пошкодження МП шкірного покриву годувальника генерує у нього захисні рефлекторні реакції в нейроендокринній та імунній системі; по-друге, обмежена крововтрата за рахунок годування МП та наступним незначним крововиливом з ранки приводить до мобілізації регіонарного мікроциркуляторного русла й подальшого перерозподілу кровообігу, що стимулює репараційні реакції; по-третє, і найголовніше, введення в ранку під час годування більше 100 компонентів БАР у відповідній дозі й послідовності забезпечує весь спектр гомеостатичного впливу на організм годувальника [295]. У попередніх розділах та багатьох інших дослідженнях встановлено, що імунітет контролює морфогенетичний структурний гомеостаз [151, 269-273, 286]. Зокрема, встановлено, що БАР МП проявляють насамперед протизапальну дію, і цей механізм здійснюється шляхом індукції локального апоптозу імунокомпетентних клітин, тоді як на системному рівні БАР МП активують усі ланки імунної системи організму: центральні (тимус та кістковий мозок) та периферійні (селезінку) органи, мієлоїдні та лімфоїдні показники крові. Своєю чергою стимуляція імунітету забезпечує усі морфофізіологічні прояви ГВ, а саме фізичні показники ваги тіла дослідних тварин та їхнього приплоду, зокрема й репродуктивні властивості тварин [295]. Отримані експериментальні дані підтверджуються сучасними відкриттями в галузі імунології. Так, згідно інформації з попередніх розділів було доведено провідну роль у структурному гомеостазі імунної системи, яка виконує морфогенетична функція – здійснює контроль і регуляцію метаболізму, проліферацію та диференціювання клітин усіх тканин, зокрема й імунокомпетентних. Цю функцію виконує набір клонів

помірно аутореактивних без цитостатичного ефекту до стадії специфічних тканинних структур Т - та В - лімфоцитів. Вони здійснюють тонку регуляцію диференціювання клітин у тканинах за умови фізіологічних і репаративних регенерацій. Окрім того, в останнє десятиліття виявлена й функціонально охарактеризована нова група імунокомпетентних клітин – вроджені лімфоїдні клітини (англ. ILC) [299]. Вони є відносно резидентними клітинами, інфільтрують відповідні органи та першими реагують на зміну структурного мікрооточення, а потім здійснюють цитокинову мобілізацію клітин вродженого й надалі клоноспецифічного (Т - і В - лімфоцитів) адаптивного імунітету на відтворення структурного гомеостазу, контролюючи метаболічні та морфогенетичні реакції клітин усіх тканин. Водночас клональні Т - і В -лімфоцити здійснюють тонку регуляцію диференціювання клітин у тканинах за їх фізіологічної, а також репаративної регенерації [299]. Варто зауважити, що позитивний вплив БАР МП на самиць дослідних тварин, який представлений у попередніх розділах, і надалі реалізувався адекватними показниками в їх приплоду: можливе за рахунок активації морфогенетичної функції імунної системи. Однак, повертаючись до нашого досліджу, варто зауважити, що вищезазначені позитивні ефекти впливу БАР МП мали місце й у приплоду від дослідних шурів, які народжувалися від інтактних до ГВ самиць. Цей феномен, ймовірно, зумовлений якістю еякуляту дослідних самців, що виявлений вперше. Однак механізм його здійснення ще потребує подальших спрямованих експериментальних досліджень. На, що направлені наступні експериментальні дослідження, які представлені в наступному розділі. При цьому, незважаючи на таку невизначеність, дослідження цього розділу допоможуть наблизити до вирішення проблем запліднення у людей та тварин і відкриває новий напрям у вивченні статевих репродуктивних відносин.

## **РОЗДІЛ 6. НЕПРЯМИЙ ВПЛИВ КОМПЛЕКСУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН *HIRUDO VERBANA* НА ІМУННУ СИСТЕМУ ЩУРІВ**

Дослідження цього розділу присвячені вивченню непрямого імуномодулюючого ефекту від ГВ МП на кількісні та функціональні показники периферичної крові, морфометричні параметри тіла, морфометричні, морфологічні та цитологічні показники лімфоїдних органів імунної системи статевозрілих лабораторних самиць щурів та їхнього приплоду в динаміці: на 30 та 60 добу

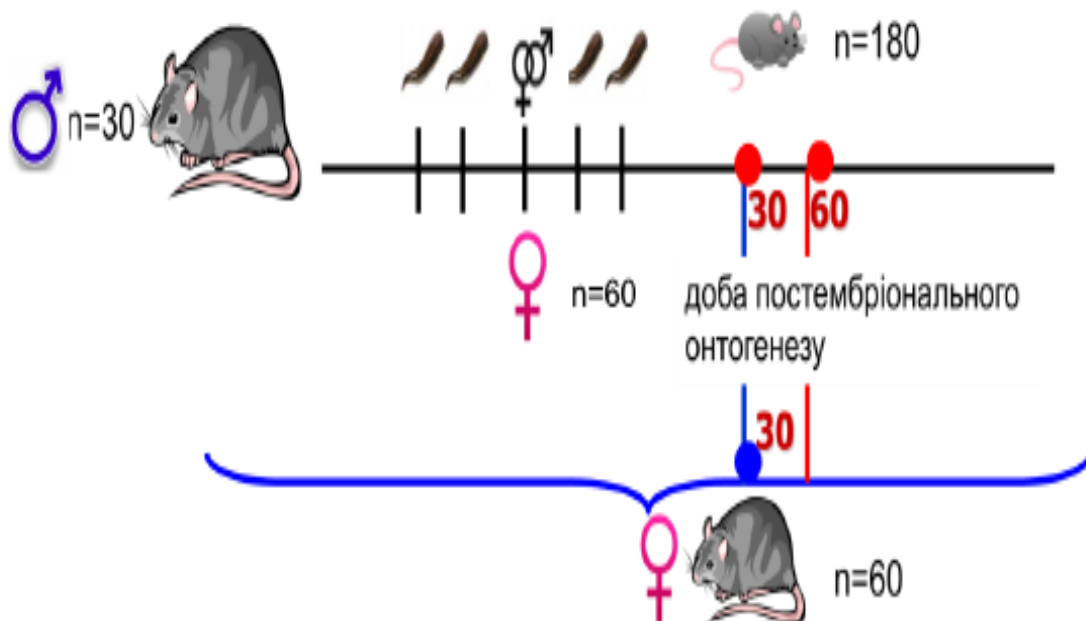
### **Схема експериментальних досліджень**

В експеримент було взято 30 нелінійних лабораторних білих щурів-самців, 60 щурів-самиць та їхній приплід (n=180).

Тварини були розподілені з використанням принципу рандомізації на 2 групи, кожна з яких містила по 15 щурів-самців та 30 щурів-самиць рис. 6.1:

1) контрольна група щурів-самиць, які були спарені із інтактними самцями та їхній приплід.

2) дослідна група щурів-самиць, які були спарені з дослідними самцями, яким до спарювання робилися приставки на куприкову ділянку МП *Hirudo verbana*, один раз на тиждень (двічі перед спарюванням з інтактними самицями та двічі після). Самиць до самців підсаджували після виконання другої приставки МП і тримали із самцями до вагітності самиць упродовж 2 тижнів. Приплід від дослідної та контрольної груп самців отримували після спарювання з інтактними до ГВ самицями. Проводився аналіз приплоду при народженні – визначалася смертність та загальна вага. У самок та приплоду в динаміці на 30 та 60 добу досліджувалися гематологічні, імунологічні, біохімічні та гістологічні показники [300].



### Дослідження:

- тривалості вагітності, чисельності, загальної ваги та смертності приплоду;
- цитоморфологічних характеристик центрального лімфоїдного органу
- гематологічних показників;
- фагоцитарної активності нейтрофілів;
- оксидативного метаболізму нейтрофілів;

● часова точка збору біологічного матеріалу у самиць

● часові точки збору біологічного матеріалу у приплоду



гірудологічний вплив

Рис. 6.1. Схема проведених експериментальних досліджень

## Чисельність, загальна вага та смертність приплоду

До настання вагітності в дослідній групі самиць не було відмінностей за всіма гематологічними та імунологічними показниками крові порівняно з контрольною групою тварин, що підтверджує їх фізіологічно здоровий стан. Під час дослідження приплоду від самиць і самців дослідної групи було зареєстровано значне збільшення їх чисельності (в середньому на 45,9 %) та загальної ваги (на 48,2 %) порівняно з контрольною групою ( $p < 0,05$ ) (табл. 6.1) [300].

**Таблиця 6.1. Середні показники чисельності та загальної ваги приплоду**

Група тварин		Показники приплоду		Кількість народжених мертвих тварин (шт.)
		Кількість (шт.)	Загальна вага (г)	
Самиці	контроль	5,3±1,0	35,3±7,0	0,9±0,02
	експеримент	9,8±1,4*	68,1±5,1*	0,0001±0,0000001*

Примітка:\* - показники, що достовірно відрізняються від контролю ( $p \leq 0,05$ ) [300].

У дослідній групі народжувалися завжди активні та здорові тварини порівняно з контрольною, у якій іноді народжувався частково мертвий приплід ( $p < 0,05$ ) (табл. 6.1). В середньому вагітність самиць у обох групах була в межах референтних значень (табл. 6.2) [300].

**Таблиця 6.2. Тривалість вагітності самиць та смертність приплоду**

Групи тварин	Показники (днів)	
	В середньому	Коливання
Контроль	23	22-24
Експеримент	21	19-22

При аналізі гематологічних показників крові у дослідної групи самиць та у їхнього приплоду було виявлено статистичне збільшення загальної кількості лейкоцитів та еритроцитів порівняно з контрольною групою, але в межах референтних значень ( $P \leq 0,05$ ) (табл. 6.3) [300].

## Гематологічні, імунологічні та гістологічні показники самиць та їх приплоду

**Таблиця 6.3.** Гематологічні та імунологічні показники крові самиць щурів після вагітності та їхнього приплоду

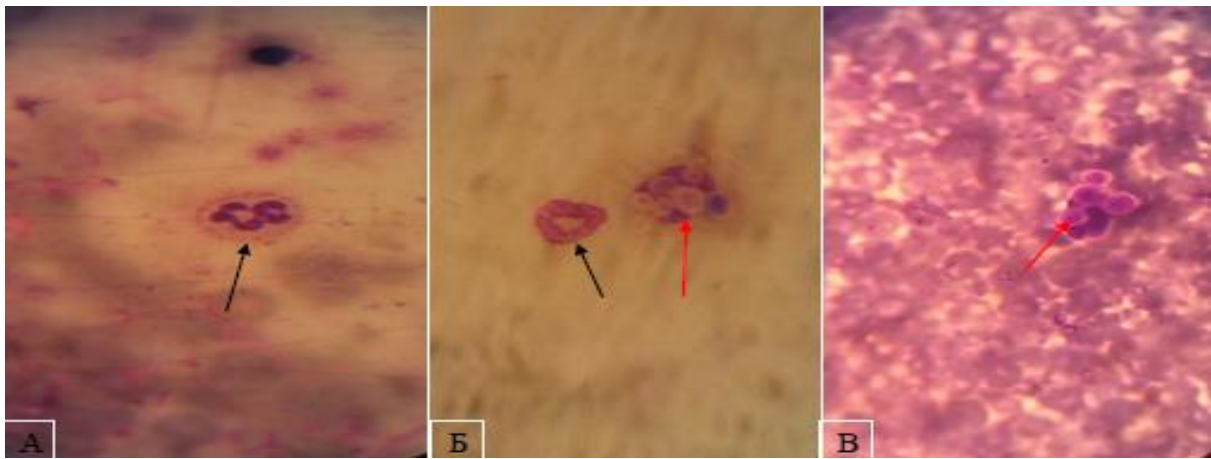
Показники		Контрольна група			Дослідна група		
		Самиці	Приплід		Самиці	Приплід	
			30 - доба	60 - доба		30 - доба	60 - доба
Загальна кількість лейкоцитів $10^9/l$		5.01± 0.4	4.0± 0.3	4.55± 0.5	7.9± 0.5*	5.4± 0.2*	14.1± 0.7*
Загальна кількість еритроцитів $10^{12}/l$		6.9± 0.3	3.5± 0.4	5.06± 0.3	8.7± 0.5*	5.07± 0.3*	5.99± 0.4*
Лейкоцитарна формула крові,%	Сігментоядерні нейтрофіли	14.21± 0.75	11.5± 0.6	6.3± 0.6	13.92± 0.61	11.52± 0.5	4.3± 0.7
	Паличкоядерні нейтрофіли	12.10± 0.55	3.6± 0.7	2.7± 0.3	13.31± 0.85	4.0± 0.5	2.61± 0.4
	Лімфоцити	73.47± 0.84	84.7± 1.2	90± 2.1	72.52± 0.93	84.3± 2.2	92.1± .0
	Еозінофіли	0.22± 0.03	0.20± 0.01	1± 0.07	0.25± 0.03	0.18± 0.03	0.99± 0.03
Фагоцитарний індекс,%		50.31± 1.1	74.21± 1.2	70.33± 1.2	82.11± 1.4*	74.70± 1.6	74.74± 1.4*
Фагоцитарне число		3.41± 0.05	4.64± 0.07	4.33± 0.05	3.74± 0.08*	4.68± 0.08	5.76± 0.08*
НСТ сп., %		38.21± 1.7	61.69± 2.1	42.8± 3.2	52.04± 1.4*	79.02± 3.2*	72.79± 4.1*
НСТ нав., %		46.34± 1.8	67.93± 1.9	48.28± 2.1	61.05± 2.1*	85.58± 2.3*	74.27± 2.7*

\* – показники, які достовірно відрізняються від контрольної групи ( $P \leq 0,05$ ); сп. – спонтанний; нав. – навантаження; НСТ – тест на нітросиній тетразолний [300].

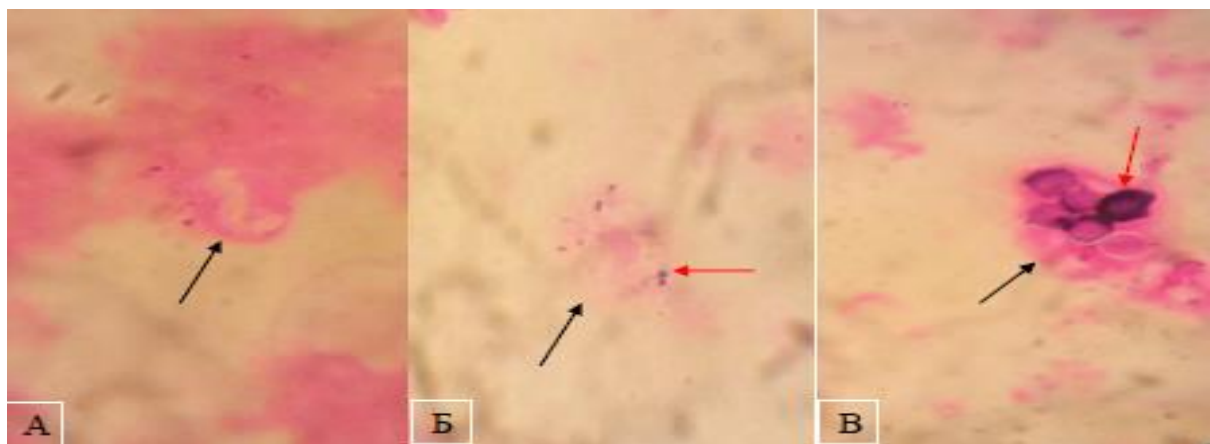
Це свідчить про позитивну стимулюючу дію БАР МП на лейкопоез і еритропоез. Слід також зазначити, що лейкоцитарна формула крові дослідної групи самиць та їх приплоду була збалансованою та статистично не відрізнялася від контрольної групи (табл. 6.3) [300].

Не пряму імуностимулюючу дію БАР МП було підтверджено також аналізом показників поглинаючої та метаболічної активності нейтрофілів у самиць та їхнього приплоду, які зростали в межах референтних значень (табл. 6.3, рис. 6.2 та 6.3) [300].





**Рис. 6.2. Фагоцитоз нейтрофілів: А – неактивні, Б і В – активні нейтрофіли. Чорний вказує на не активований нейтрофіл, червоний вказує на активований нейтрофіл [300].**



**Рис. 6.3. Нітросиній тетразолний тест: А – неактивний, Б – спонтанний тест, активний нейтрофіл, В – навантажувальний тест, активний нейтрофіл. Чорні стрілки вказують на нейтрофіли, червоні стрілки вказують на гранули нітросинього тетразолу [300].**

При дослідженні поглинаючої активності в дослідній групі у самиць та у їхнього приплоду на 60 добу було відмічене достовірне підвищення ФІ та ФЧ (табл. 6.3) ( $P \leq 0,05$ ). У самиць: ФІ всередньому зростав на 9,6 %, а ФЧ на 8,8 %; на 60 добу у приплода ФІ всередньому зростав на 5,9 %, а ФЧ на 24,8 %. Відмічалось незначне збільшення цих показників на 30 добу порівняно з контрольною групою тварин. При дослідженні метаболічної активності у дослідної групи самиць та у їхнього приплоду: всі показники достовірно підвищувалися як у спонтанних (на 26,6 %, 21,9 % та 41,2 % відповідно), так і в навантажувальних (на 24,1 %, 26,6 % та 35 % відповідно) тестах (табл. 6.3) ( $P \leq 0,05$ ) [300]. При морфологічному аналізі центрального органу імунної

системи (тимуса) у дослідній групі самиць та їхнього приплоду було виявлено у корковій та в мозковій речовинах, збільшення кількості клітин на одиницю площі (рис. 6.4–6.7), переважання коркової речовини тимуса над мозковою, що вказує на непряму стимулюючу дію БАР МП [300].

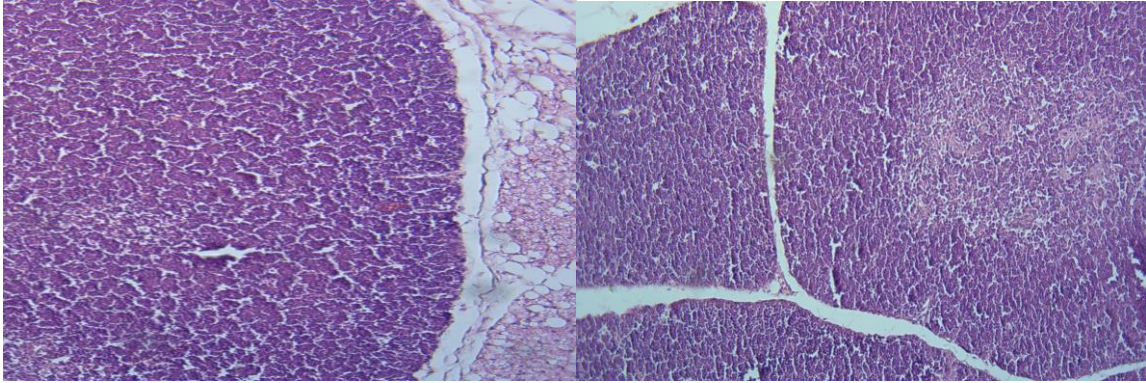


Рис. 6.4. Тимус самиці щурів: А – контрольна група, Б – дослідна група [300].

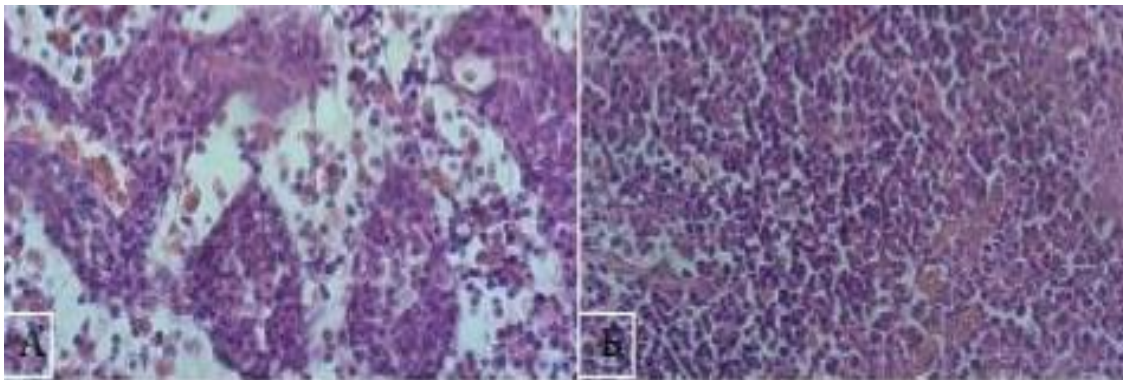


Рис. 6.5. Тимус самиці щурів: А – контрольна група, Б – дослідна група [300].

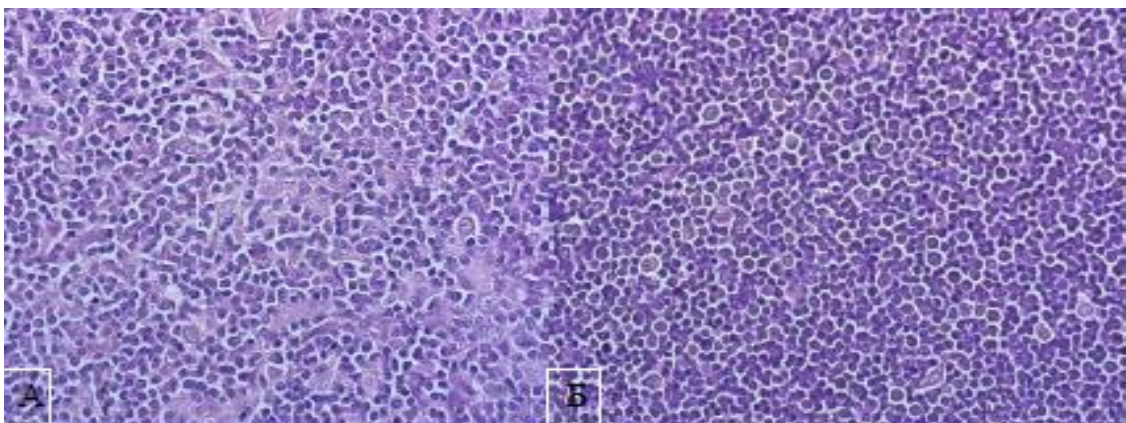


Рис. 6.6. Тимус приплоду на 30 добу: А – контрольна група, Б – дослідна група [300].

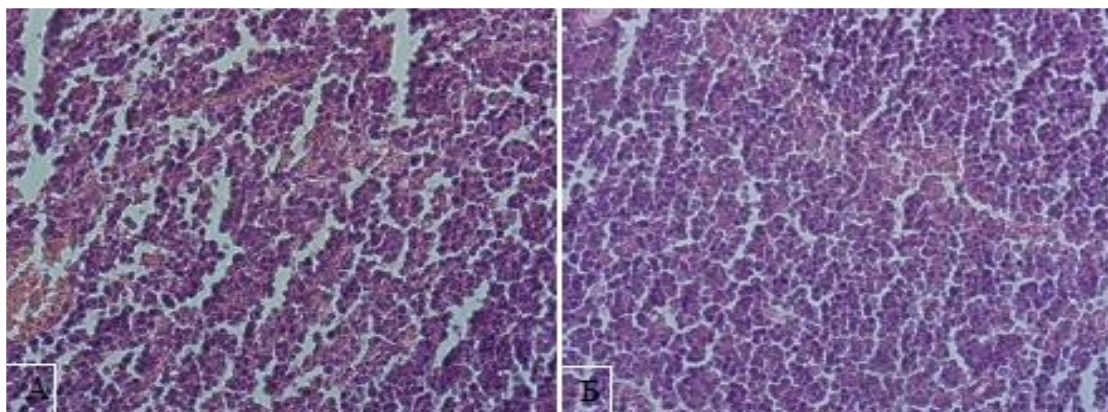


Рис. 6.7. Тимус приплоду на 60 добу: А – контрольна група, Б – дослідна група [300].

У контрольної групи самиць щурів тимус переходив в інволюцію, що характеризував вікові фізіологічні зміни тварини. Дослідження коркової речовини тимусу у дослідної групи приплоду зареєстрував збільшення кількості клітин на одиницю площі (400 мкм<sup>2</sup>) на 30 (31,20 %) і 60 (35,65 %) добу порівняно з контрольною групою. При дослідженні мозкової речовини у дослідної групи приплоду кількість клітин на одиницю площі (400 мкм<sup>2</sup>) збільшувалася на 30 (3,44 %) добу [300].

### Узагальнення 6 розділу

Підвищення гематологічних та імунологічних показників крові, кількості лімфоцитів в центральному лімфоїдному органі (тимусу) при гістологічному дослідженні у дослідної групи самиць та їхнього приплоду, може свідчити про не прямий імуностимулюючий вплив БАР МП *H. verbana*, який шляхом стимуляції імунної системи самиць щурів, здатний відобразити цей вплив вже на їхньому приплоді, а також впливати на імунітет їх самих. Можливо, підвищення імунітету у приплоду щурів пов'язане зі зменшенням дефекту сперматозоїдів через вплив БАР МП [299]. Це також підтверджується дослідженнями попереднього розділу, в якому показано значне збільшення кількості сперматозоїдів, їх фертильності, а також зменшення їх дефектів під впливом БАР МП *H. verbana*, порівняно з контрольною групою тварини. В еякуляті щурів знаходиться невелика кількість нейтрофілів, які, як відомо, відіграють важливу роль у процесах проліферації та диференціації усіх клітин

і тканин [282, 283], а також містяться цитокіни та багато інших БАР, які можуть вплинути на нормальне фізіологічне запліднення, а також можуть стимулювати імунну систему матері і, зрештою, імунітет їхнього приплоду. І головну роль стимуляції тут вже виконують БАР МП, які, як відомо, позитивно впливають на нейтрофіли та співвідношення цитокінів, що спостерігається в отриманих результатах при аналізі фагоцитарної та метаболічної активності нейтрофілів. Нейтрофіли можуть жити протягом 5 діб [279, 277]. Отже, можливо, що нейтрофіли в еякуляті, а також продукти їх розпаду, на які безпосередньо впливають речовини БАР МП, можуть впливати як на імунну систему матері, так і на процеси зачаття, а в кінцевій стадії – на імунітет приплоду. Слід зазначити, що тільки самці зазнавали прямого впливу БАР МП, а самиці і їхній приплід не отримували ці речовини безпосередньо, вагітність у тварин обох груп була фізіологічною і становила в середньому 24 доби [300]. У дослідній групі спостерігалось подвійне запліднення порівняно з контрольною групою тварин - це не звичайне явище серед тварин. Нащадки дослідної групи мали більшу вагу порівняно з контрольною групою. Піддослідні самиці в середньому народжували більше приплоду, ніж контрольна група. Цей феномен виявлений вперше.

## **РОЗДІЛ 7. КОРЕКЦІЯ ІМУНОСУПРЕСИВНОГО СТАНУ САМЦІВ ЩУРІВ НА ФОНІ ВВЕДЕННЯ ВОДНО-СОЛЬОВОГО ЕКСТРАКТУ МЕДИЧНИХ П'ЯВОК**

Експериментальні дослідження цього розділу були присвячені отриманню корегуючої хімічної імуносупресивної моделі на статевозрілих нелінійних білих лабораторних самцях-щурів для подальшого вивчення імуномодельючої дії на цю модель водно-сольового екстракту із тіл МП виду *Hirudo verbana*, з подальшим дослідженням кількісних та функціональних показників периферичної крові, морфометричних параметрів тіла, морфометричних, морфологічних та цитологічних показників лімфоїдних органів імунної системи.

### **Отримання корегуючої хімічної імуносупресивної моделі**

#### **Схема експериментального дослідження**

Для моделювання імуносупресії у дослідних групах тварин використовувався «Ендоксан», порошок для приготування розчину для ін'єкцій по 200 мг, виробництва «BaxterOncologyGmbH» (Німеччина), який був приготовлений на фізіологічному розчині. Він вводився внутрішньочеревно статевозрілим нелінійним лабораторним білим самцям щурів після формування 4 дослідних груп по 20 тварин у кожній, всього 60 тварин [301]:

- 1) контроль;
- 2) ендоксан в дозі 50 мг/кг (1 раз на добу: 2 рази);
- 3) ендоксан в дозі 100 мг/кг;
- 4) ендоксан в дозі 150 мг/кг рис. 7.1. [301].

У тварин протягом 22 діб оцінювалася: смертність, зовнішній вигляд шкіри та шерсті. У здорових тварин при повноцінній годівлі й добрих умовах утримання шерстяний покрив густий, гладенький, щільно прилягає до шкіри

[301]. При дослідженні шкіри проводилася оцінка: порушення цілісності, шкірні висипи. На 22 добу тварин після дислокації шийних хребців декапітували. Бралася кров з додаванням антикоагулянту – 2 % гепарину (9/1). Після чого досліджувалися гематологічні показники за загальноприйнятими методами та імунологічні показники: ФАН [264]. Морфометричні та цитологічні дослідження тимусу проводилися безпосередньо на гістологічних препаратах зроблених за загальноприйнятими методами [261].

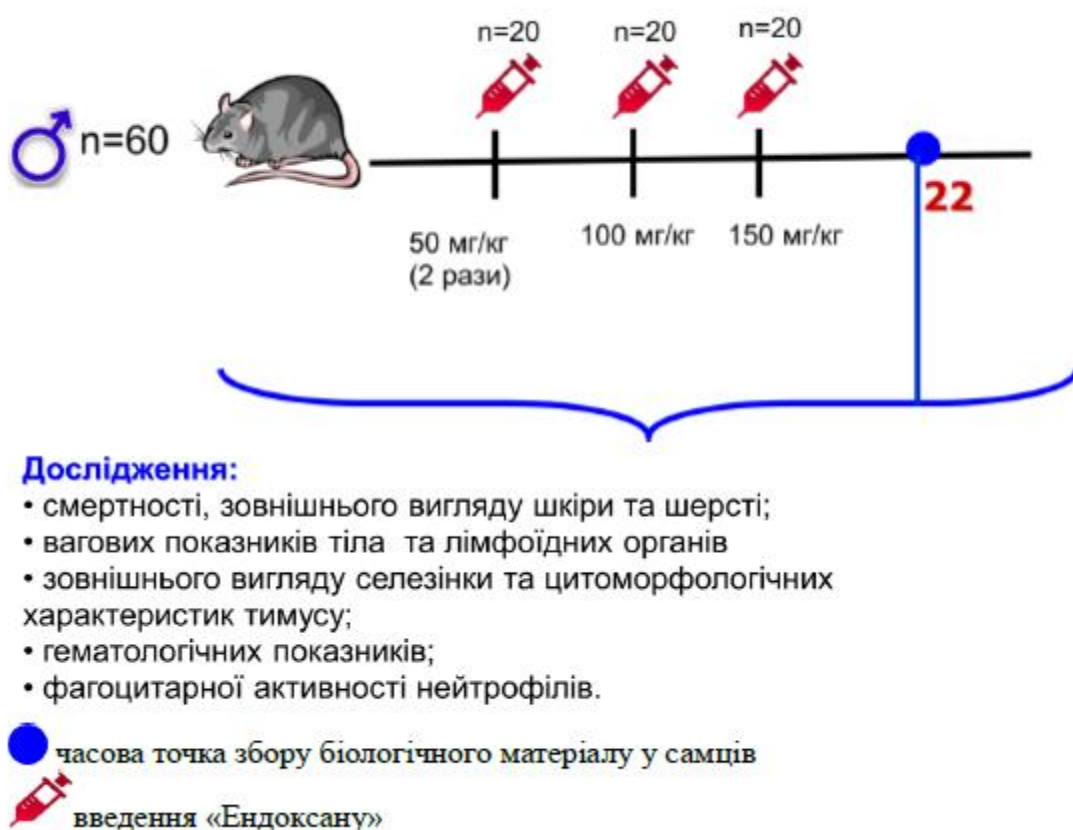
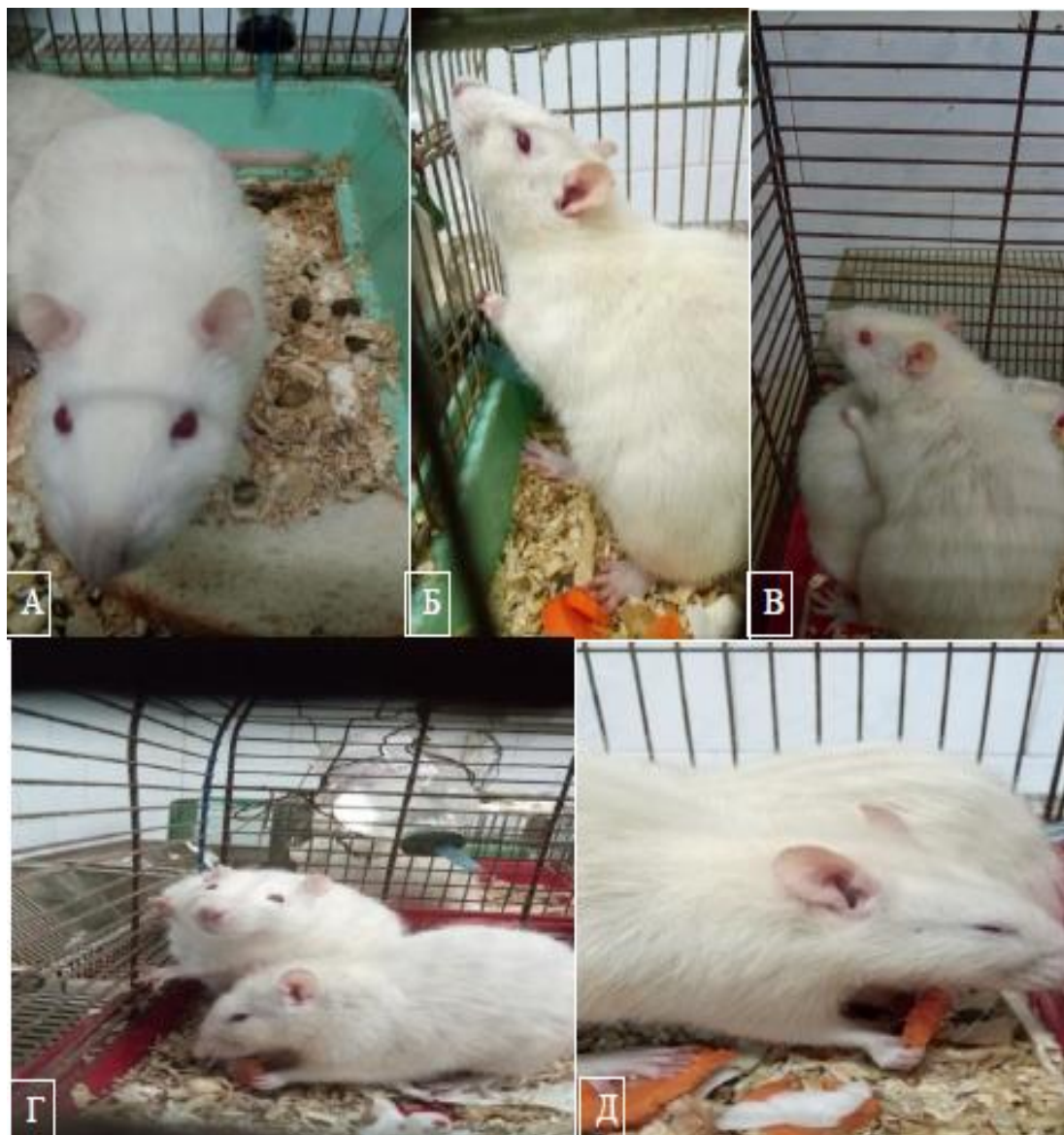


Рис. 7.1. Схема проведених експериментальних досліджень

## Дослід

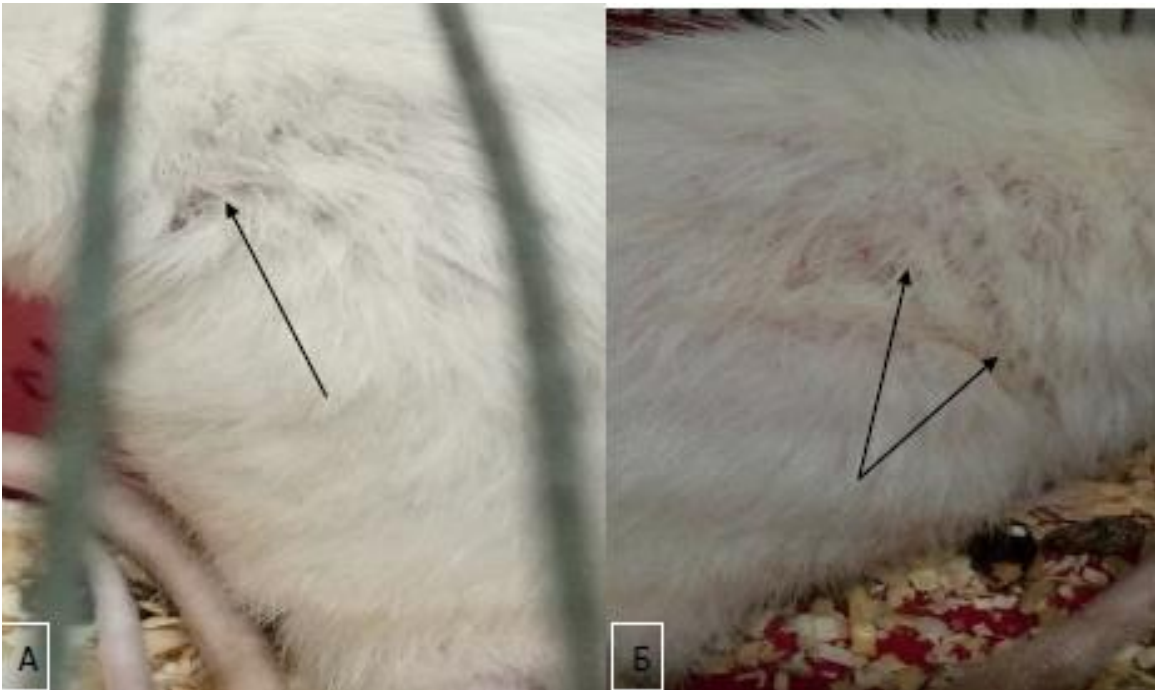
Уже на перший день експерименту дослідні тварини 3-ої та 4-ої груп після уведення ендоксану виглядали сонливими та в'ялими порівняно з контрольною групою тварин (рис. 7.2).

Починаючи з 2 доби у 3-ої та 4-ої груп тварин шерсть становиться дибки, особливо візуально це проявлялося у 4-ої групи тварин у порівнянні з контрольною групою (рис. 7.2) [301].



**Рис. 7.2.** Зовнішній стан тварини на 2 добу: а – контроль; б – 50 мг/кг; в – 100 концентрація; г, д – 150 мг/кг [301].

На 3 добу всі дослідні групи тварин дуже сонливі та в'ялі порівняно з контрольною групою. На 4 добу у 4-ої групи з'явилася агресивність, яка проявлялася нападами на дослідника при годуванні. У 4-ої групи на 6 добу, а у 3-ої групи на 7 добу почала випадати шерсть, а на місці випадіння спостерігалися свіжі та засохлі рани (рис. 7.3) [301].



**Рис. 7.3.** Рани після випадіння шерсті на 6 добу: а – 100 мг/кг; б – 150 мг/кг, стрілками позначені ранки після випадіння шерсті [301].

Вага тіла у всіх дослідних групах знижувалася порівняно з контрольною групою в середньому на 9,3 %, 10,2 % та 18,5 % відповідно. (табл. 7.1) [301].

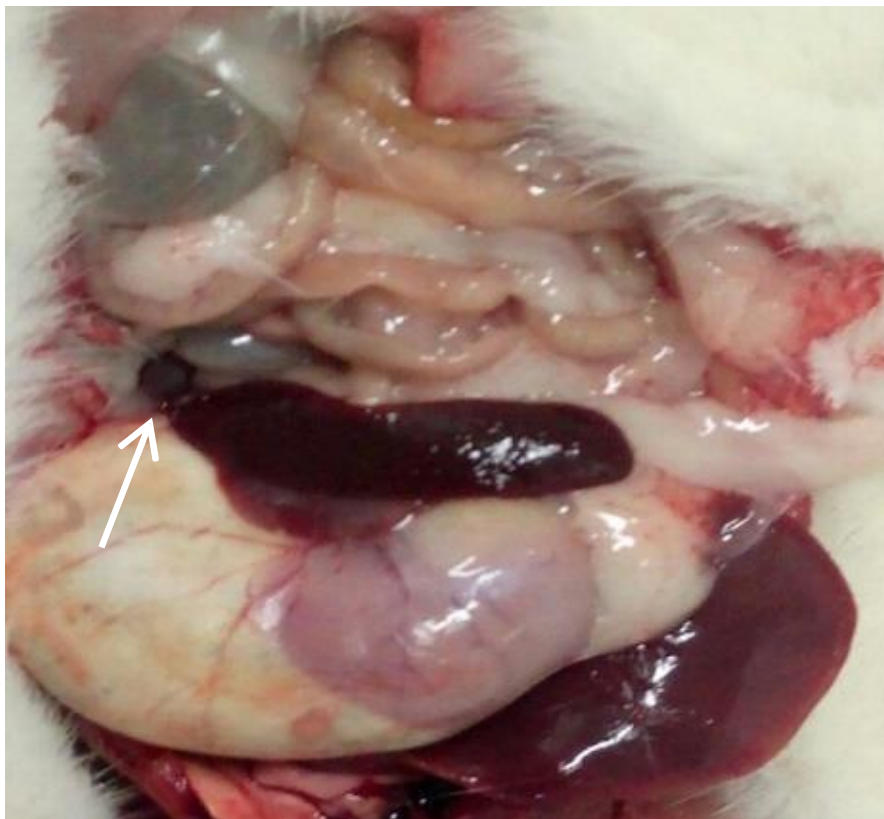
**Таблиця 7.1.** Зміни ваги тіла та лімфоїдних органів на 22 добу

Вага	Група тварин			
	1 Контроль	Дослід		
		2 Ендоксан (50 мг/кг)	3 Ендоксан (100 мг/кг)	4 Ендоксан (150 мг/кг)
Тіла (г)	420,5±17,3	381,5±15,4*	377,5±19,1*	342,5±21,2*
Селезінки (мг)	1199,0±25,5	1171,4±23,1	1050,3±15,1*	1001,3±22,6*
Тимусу (мг)	270,2±13,1	160,1±20,3*	153,4±19,1*	130,3±24,1*

Примітка: \* - показники, що достовірно відрізняються від контролю ( $p \leq 0,05$ ) [301].

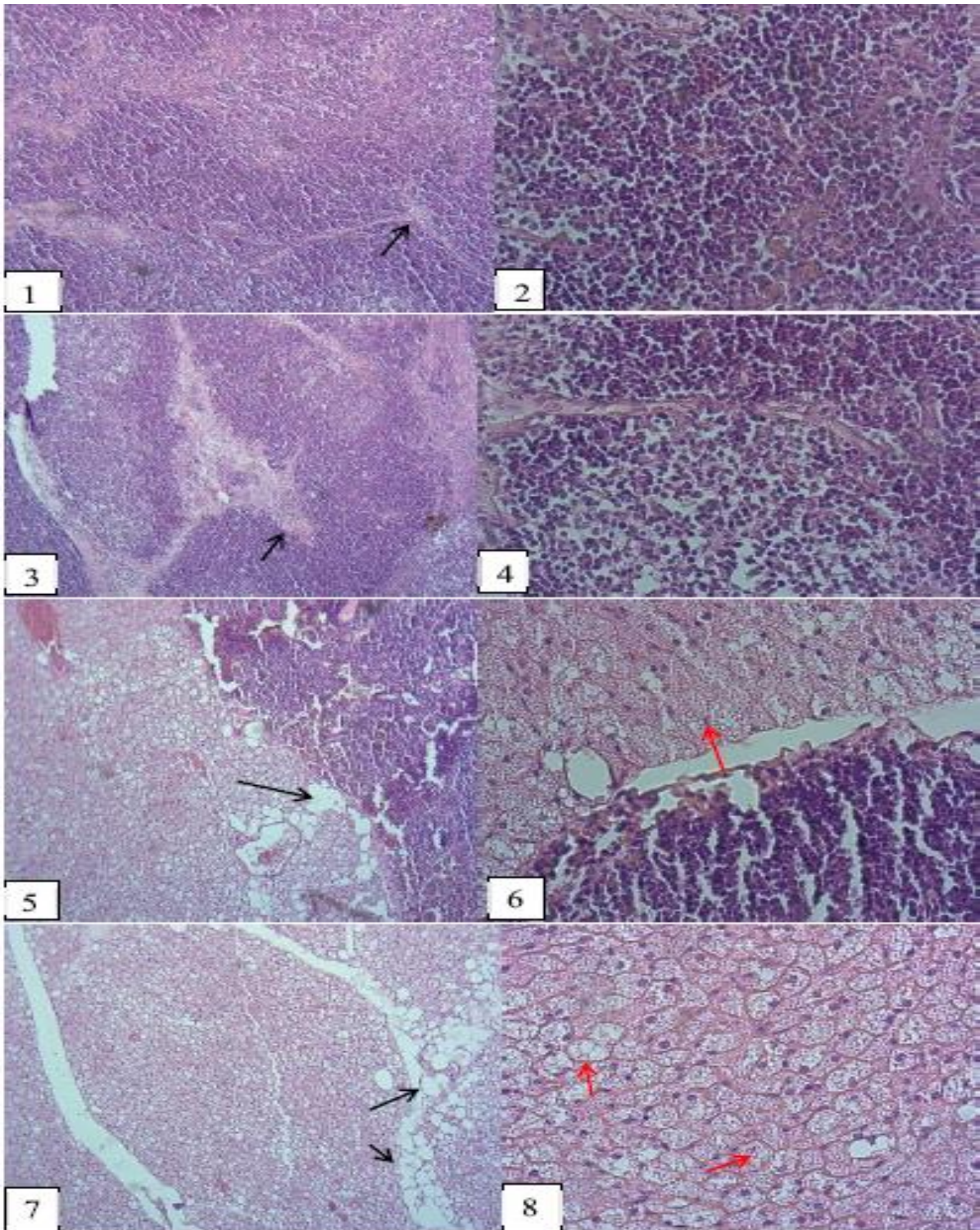


На 22 добу дослідження було зареєстроване зниження ваги селезінки у 3-ої та 4-ої груп (на 12,4% та 16,5 % відповідно) порівняно з контрольною групою  $p < 0,05$ . При зовнішньому огляді селезінки при дозі 150 мг/кг, спостерігалася її деформація у вигляді скручування з одного краю (рис. 7.4) [301].



**Рис. 7.4. Зовнішній вигляд селезінки: білою стрілкою позначена деформація [301].**

При гістологічному аналізі центрального лімфоїдного органу (тимусу) при дозі ендоксану 50 мг/кг (1 раз на добу: 2 рази) він не відрізняється від контрольної групи (рис. 7.5: 1-4). При дозі 100 мг/кг нормальні тканини тимусу заміщаються жировою та сполучною тканинами (рис. 7.5: 5, 6). Введення дози 150 мг/кг ендоксану сприяло практично повній заміні нормальної тканини в жирову та сполучну (рис. 7.5: 7, 8) [301].



**Рис. 7.5.** Гістологічний препарат тимусу: 1, 2 контрольна група, 3,4 доза препарату 50 мг/кг, 5,6 доза препарату 100 мг/кг, 7,8 доза препарату 150 мг/кг.(1, 3, 5, 7 збільшення – х200; 2, 4, 6, 8 – х600), червоними стрілками позначена сполучна тканина, а чорними стрілками позначено жирову тканину, які замінили лімфоїдну тканину [301].

Загальна кількість лейкоцитів та еритроцитів статистично знижувалася, у 2-ої групи на 5,5 %, у 3-ої групи на 20 %, і особливо у 4-ої групи (на 40 %) при дозі ендоксану 150 мг/кг  $p < 0,05$  (табл. 7.2) [301].

**Таблиця 7.2. Загальна кількість еритроцитів та лейкоцитів/л на 22 добу**

Загальна кількість/л	Група тварин			
	1 Контроль	Дослід		
		2 Ендоксан (50 мг/кг)	3 Ендоксан (100 мг/кг)	4 Ендоксан (150 мг/кг)
Лейкоцити	15,6±0,4	11,5±0,6*	9,1±0,3*	8,3±0,7*
Еритроцити	9,0±0,2	8,5±0,3*	7,2±0,5*	5,4±0,4*

Примітка: \* - показники, що достовірно відрізняються від контролю ( $p \leq 0,05$ ) [301].

В лейкоцитарній формулі крові порівняно з контрольною у всіх дослідних групах тварин було виявлене різке зниження лімфоцитів (на 17,2 %, 22,3 % та 24,6 % відповідно), при відповідному підвищенні сегментоядерних нейтрофілів (на 56,08 %, 53,04 % та 55,3 % відповідно) та їх незрілих форм (на 68,7 %, 81,2 % та 82,7 % відповідно)  $p \leq 0,05$  (табл. 7.3). Абсолютна кількість нейтрофілів збільшувалася зі зниженням абсолютної кількості лімфоцитів та еозинофілів, порівняно з контрольною групою тварин  $p \leq 0,05$  (табл. 7.3) [301].

**Таблиця 7.3. Лейкоцитарна формула крові та загальна кількість лейкоцитів**

Групи тварин		Лейкоцитарна формула крові, % / абсолютна кількість				
		Нейтрофіли		Лімфоцити	Моноцити	Еозинофіли
		Сегментоядерні	Паличкоядерні			
1 Контроль		$\frac{7,33 \pm 0,09}{1,14 \pm 0,04}$	$\frac{2,66 \pm 0,04}{0,41 \pm 0,02}$	$\frac{89,09 \pm 2,05}{13,89 \pm 0,10}$	$\frac{0,57 \pm 0,09}{0,09 \pm 0,01}$	$\frac{0,35 \pm 0,05}{0,05 \pm 0,001}$
Дослід	2 Ендоксан (50 мг/кг)	$\frac{16,69 \pm 0,12^*}{1,91 \pm 0,05^*}$	$\frac{8,50 \pm 0,06^*}{0,97 \pm 0,03^*}$	$\frac{73,79 \pm 3,11^*}{8,48 \pm 0,09^*}$	$\frac{0,77 \pm 0,12}{0,09 \pm 0,008}$	$\frac{0,25 \pm 0,06}{0,03 \pm 0,003^*}$
	3 Ендоксан (100 мг/кг)	$\frac{15,61 \pm 0,11^*}{1,42 \pm 0,03^*}$	$\frac{14,12 \pm 0,10^*}{1,28 \pm 0,02^*}$	$\frac{69,17 \pm 2,9^*}{6,29 \pm 0,03^*}$	$\frac{0,84 \pm 0,22}{0,08 \pm 0,009}$	$\frac{0,26 \pm 0,04}{0,02 \pm 0,001^*}$
	4 Ендоксан (150 мг/кг)	$\frac{16,40 \pm 0,13^*}{1,36 \pm 0,04^*}$	$\frac{15,40 \pm 0,11^*}{1,27 \pm 0,02^*}$	$\frac{67,15 \pm 2,5^*}{5,57 \pm 0,02^*}$	$\frac{0,80 \pm 0,23}{0,07 \pm 0,006}$	$\frac{0,25 \pm 0,07}{0,03 \pm 0,002^*}$

Примітка: \* - показники, що достовірно відрізняються від контролю ( $p \leq 0,05$ ) [301].

Із збільшенням дози цитостатику виявлялося різке зниження ФІ порівняно з контрольною групою: при дозі ендоксану 50 мг/кг (1 раз на добу: 2 рази) на 66,0 %, при дозі ендоксану 100 мг/кг на 74,1 %, при дозі ендоксану 150 мг/кг 87,2 %  $p \leq 0,05$  (табл. 7.3) [301].

Починаючи з дози ендоксану 100 мг/кг ФЧ нейтрофілів порівняно з контрольною групою знижувалося в середньому на 19,9 %, а при дозі ендоксану 150 мг/кг – на 44,5 % (табл. 7.4) [301].

**Таблиця 7.4. Зміна фагоцитарної активності нейтрофілів на 22 добу**

Група тварин	Фагоцитарний індекс	Фагоцитарне число
1 Контроль	55,4±3,4	3,26±0,10
2 50 мг/кг	18,81±2,7*	3,21±0,09
3 100 мг/кг	14,35±1,8*	2,61±0,20*
4 150 мг/кг	7,08±1,1*	1,81±0,12*

Примітка: \* - показники, що достовірно відрізняються від контролю ( $p \leq 0,05$ ) [301].

### **Узагальнення першої частини 7 розділу**

Отримані результати цього розділу співпадають з даними інших дослідників, що циклофосфамід і лікарські засоби на його основі, перш за все інгібують лімфоїдну тканину [302, 303]. Цитотоксична дія ендоксану базується на взаємодії між алкілюючими метаболітами і ДНК. Це алкілування призводить до розриву та перехресного з'єднання поперечних зв'язків ниток ДНК та ДНК-білків. У результаті чого в клітинному циклі сповільнюється перебіг фази G2 та блокується подальше проходження мітотичного циклу, в результаті клітини апоптозуються [301, 304, 305]. В разі тимусу, ці обставини, викликають апоптотичне його спустошення, як центрального лімфоїдного органу, так і Т-зони периферичних лімфоїдних органів [303]. В результаті в периферичній крові ми спостерігаємо зменшення кількості лейкоцитів, в основному за

рахунок зниження лімфоцитів при адекватному збільшенні основних гранулоцитів – нейтрофілів. Проте, слід відмітити, що і мієлоїдна тканина піддавалася негативному впливу цього цитостатику, про що свідчить різке значне зниження кількості еритроцитів, а також зрушення диференціювання нейтрофільних гранулоцитів із появою незрілих паличкоядерних форм при їх загальному збільшенні рециркуляції у внутрішньому середовищі. Нейтрофільний зсув вліво відбувався за рахунок їх підвищеної цитотоксичної загибелі, а також в результаті їх підвищених втрат на виконання функціональних властивостей при локальних та системних запальних реакціях [301, 306]. Установлена за останній час філогенетична інтегральна єдність вродженого і адаптивного імунітету, яка ґрунтується на наявності патернів на біополімерах та патернрозпізнаючих рецепторів [307], кількісні зміни лейкоцитів супроводжуються порушенням і їх функції, що і було встановлено в експериментах даного підрозділу. Так, ФІ і ФЧ основних фагоцитуючих клітин вродженого імунітету – нейтрофілів, у дослідних групах тварин різко знижується. Таким, чином негативна динаміка імунологічних показників після введення різних доз ендоксану свідчить про адекватність вибраного фармакологічного препарату за механізмом його дії, як цитостатику, для отримання імуносупресивного стану. Також, згідно досліджень [301, 308] дія циклофосфаміду продовжується на протязі місяця, після чого його ефект поступово знижується, а сам препарат поступово виводиться із організму.

### **Корекція імуносупресивного стану за допомогою біологічно активних речовин медичних п'явок**

#### **Схема експериментальних досліджень**

В експеримент було взято 60 нелінійних лабораторних білих щурів-самців.

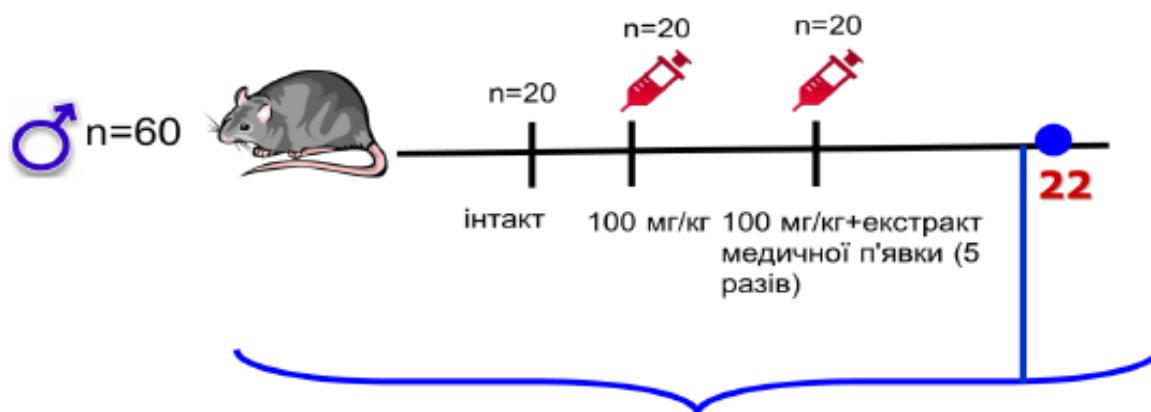
Тварини були розподілені з використанням принципу рандомізації на 3 групи, кожна з яких містила по 20 щурів-самців рис. 7.6:

- 1) контрольна група щурів-самців – без втручання;

2) перша дослідна група щурів-самців, яким вводився внутрішньочеревинно «Ендоксан» у дозі 100 мг/кг;

3) друга дослідна група щурів-самців, яким вводився внутрішньочеревинно «Ендоксан» у дозі 100 мг/кг + водно-сольовий екстракт МП.

Водно-сольовий екстракт вводився на третій день з кінцевою концентрацією 5 мкг/г тварини (1 раз через кожні 3 доби). Всього 5 разів. Самців усіх груп виводили з дослідження методом здвигу шийних хребців з подальшою декапітацією, після останнього разу введення водно-сольового екстракту. Визначалася вага тіла та тимусу, селезінки і печінки; гематологічні показники за загальноприйнятими методами. Досліджувалася морфологія тимусу.



#### Дослідження:

- вагових показників тіла;
- вагових показників селезінки, тимусу та печінки;
- цитоморфологічних характеристик тимусу;
- гематологічних показників;

● часова точка збору біологічного матеріалу у самців

🪡 ін'єкційне введення Ендоксану та водно-сольового екстракту медичної п'явки

Рис. 7.6. Схема проведених експериментальних досліджень.

## Дослід

У другій дослідній групі, якій вводився спочатку «Ендоксан», а потім водно-сольовий екстракт, спостерігалось достовірне збільшення кількості лейкоцитів (на 28,3 %) порівняно з контрольною групою, та значне збільшення у порівнянні з першою групою (на 42,8 %), якій вводився тільки «Ендоксан» (табл. 7.5).

**Таблиця 7.5. Стан показників крові, маси тіла та органів**

Показники	Група тварин		
	Контроль	Перша дослідна Ендоксан 100 мг / кг	Друга дослідна Ендоксан 100 мг / кг + 5 мкг водно- сольового екстракту <i>Hirudo verbana</i> / г тварини
Загальна кількість лейкоцитів ( $\times 10^9$ )	11,9 $\pm$ 0,49	9,5 $\pm$ 0,37*	16,6 $\pm$ 0,66*
Загальна кількість еритроцитів ( $\times 10^{12}$ )	7,7 $\pm$ 0,36	3,4 $\pm$ 0,19*	9,5 $\pm$ 0,45*
Вага тіла (г)	373,5 $\pm$ 15,4	342 $\pm$ 13,2*	366 $\pm$ 14,2
Довжина тіла (см)	22 $\pm$ 0,9	21,5 $\pm$ 0,7	23,3 $\pm$ 0,8
Вага тимусу (мг)	119 $\pm$ 4,2	89 $\pm$ 3,5*	211 $\pm$ 5,1*
Вага селезінки (мг)	1213 $\pm$ 50,1	1103 $\pm$ 44,3*	1227 $\pm$ 48,6
Вага печінки (г)	17,8 $\pm$ 0,73	13 $\pm$ 0,56*	17,3 $\pm$ 0,68

Примітка: \* - показники, що достовірно відрізняються від контролю (  $p \leq 0,05$ ).

У першій дослідній групі спостерігалось значне зниження загальної кількості лейкоцитів (на 20,2 %) у порівнянні з контрольною групою тварин (табл. 7.5).

Зменшення кількості лейкоцитів у першій групі можливо пов'язано зі зменшенням загальної кількості лімфоцитів, що відображається у лейкоцитарній формулі крові. Підвищення нейтрофілів відбувалося за рахунок зменшення лімфоцитів. «Ендоксан» більшою мірою пригнічував лімфоїдний ряд клітин, що і відображається у результатах цього та попереднього підрозділів. У другій групі всі різновиди лейкоцитів прирівнювалися до контрольної групи з незначним збільшенням лімфоцитів, за рахунок зменшення нейтрофілів. Така динаміка свідчила про пришвидшену проліферацію клітин за рахунок стимуляції від

комплексного впливу БАР водно-сольового екстракту. Загальна кількість еритроцитів достовірно знижувалася у першій дослідній групі (на 55,8 %) та значно збільшувалася у другій дослідній групі (на 18,9 %) порівняно з контрольною групою, що може свідчити про прискорену проліферацію клітин мієлопоезу на дію БАР МП. Вага тіла достовірно знижувалася у першій дослідній групі (на 8,4 %) порівняно з контрольною групою (табл. 7.5). Вага тимусу зростала у другій дослідній групі (на 43,6 %), а у першій дослідній групі навпаки знижувалася (на 25,2 %) порівняно з контрольною групою тварин (табл. 7.5). Зниження ваги у першій дослідній групі може свідчити про пригнічення лімфоїдних клітин, а в другій, навпаки, про посилення їх проліферації. Вага печінки та селезінки достовірно знижувалися у першій групі (на 27 % та 9,1 % відповідно), а в другій вага печінки та селезінки прирівнювалися до показників контрольної групи (табл. 7.5). Збільшення гематологічних показників, ваги тіла та досліджуваних органів у другій групі порівняно з контрольною, може свідчити про компенсаторну та імуностимулюючу дії водно-сольового екстракту БАР МП. Комплекс БАР корегує імуносупресивну дію ендоксану. Про що свідчить незначне підвищення лімфоцитів у лейкоцитарній формулі крові у порівнянні з контрольною групою (табл. 7.6).

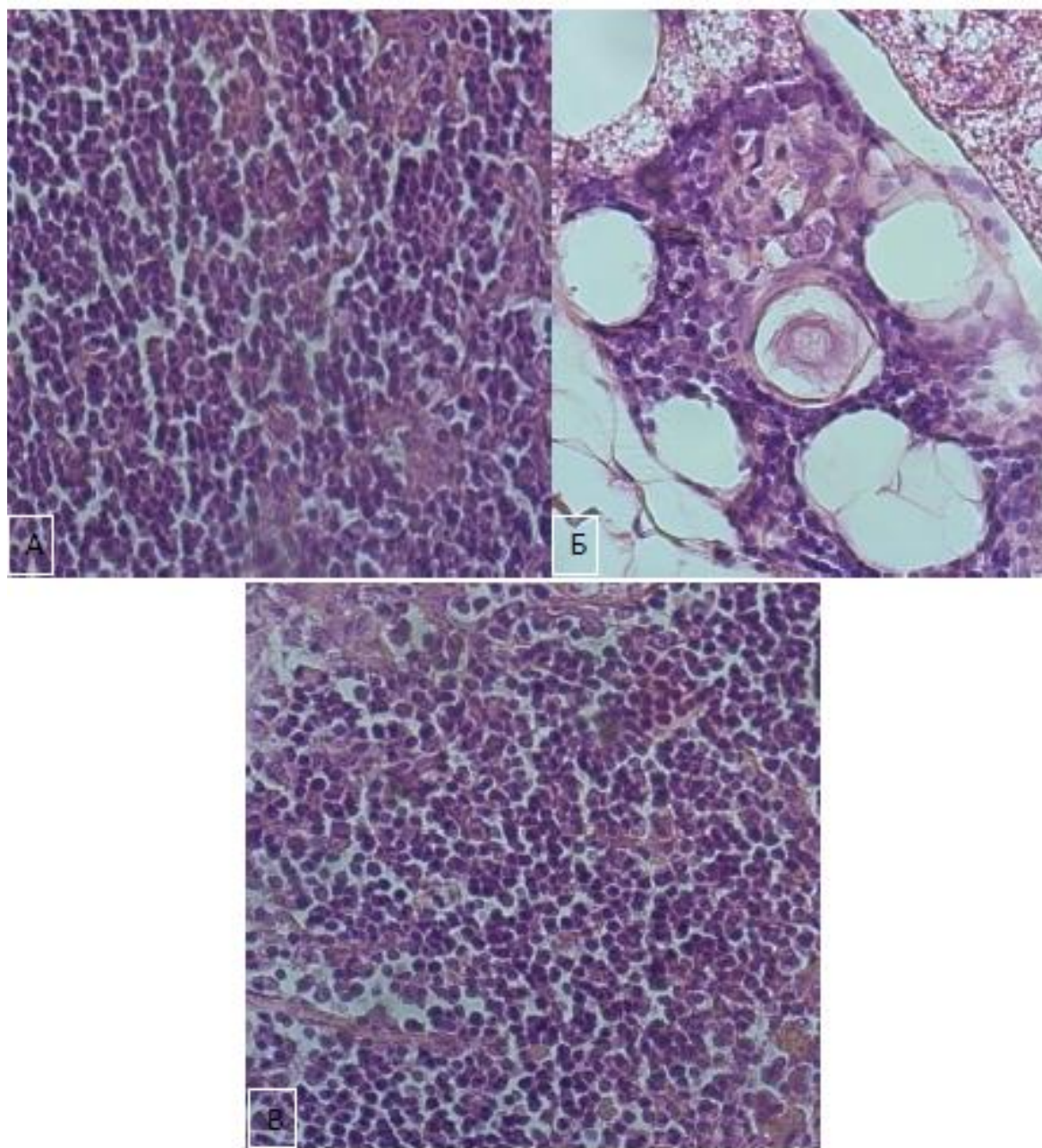
**Таблиця 7.6. Лейкоцитарна формула крові**

Група тварин		Лейкоцитарна формула, %				
		Нейтрофіли		Лімфоцити	Моноцити	Еозінофіли
		Сегментоядерні	Паличкоядерні			
Контроль		8,11±0,25	3,75±0,12	87,14±1,2	0,75±0,12	0,25±0,02
Експеримент	Перша дослідна Ендоксан 100 мг / кг	16,51±0,11 *	15,16±0,10 *	67,23±2,9 *	0,81±0,06	0,29±0,03
	Друга дослідна Ендоксан 100 мг / кг + 5 мкг водно-сольового екстракту <i>Hirudo verbana</i> / г тварини	7,50±0,27 *	2,86±0,11 *	89,56±1,1 *	0,80±0,23	0,28±0,05

Примітка: \* - показники, що достовірно відрізняються від контролю ( $p \leq 0,05$ ).



У другій групі гістологічна структура тимусу близька до контрольної групи, а в першій групі нормальні тканини органу замішались жировою та сполучною тканинами (рис. 7.7).



**Рис. 7.7. Морфологія тимуса: А) контроль; Б) ендоксан у дозі 100 мг/кг; В) ендоксан у дозі 100 мг/кг + водно-сольовий екстракт 5 мкг/г *Hirudo verbana***

## Узагальнення другої частини 7 розділу

Згідно науковим даним організм може відновлюватися після впливу цитостатиків, але якщо його доза не цитотоксична [309, 310], що дало можливість використовувати його, як хімічну модель імуносупресії для перевірки БАР МП на імуномодулюючі ефекти. Руйнування клітин та тканини тимусу у першій групі було пов'язане з дією цитостатика, що більш детально було описано у попередньому підрозділі. Згідно результатам попереднього підрозділу та дослідженням інших учених відомо, що «Ендоксан» в першу чергу впливає цитотоксично на лімфоцитарний ряд, особливо в першу чергу страждають Т – лімфоцити, тимоцити тимусу, оскільки в тимусі більшість незрілих клітин, які дуже чутливі до дії цитостатиків, що ми і спостерігали у дослідах цього та попереднього підрозділу при аналізі гістологічної структури тимусу: спустошення клітинного складу органу та заміна нормальної тканини на жирову та сполучну. Всі морфометричні, гематологічні та імунологічні показники другої групи нічим не відрізнялися від контрольної групи тварин, що може бути пов'язано з компенсаторною дією за рахунок дуже посиленого тимопоєзу та гомеостатичної проліферації від впливу БАР МП. Слід відмітити, що водно-сольовий екстракт МП не тільки відновлював нормальну морфологію тимусу, морфометричні показники тіла та органів, гематологічні показники крові після впливу цитостатику, а і підвищував деякі показники у порівнянні з контрольною групою тварин. Ці всі позитивні зрушення у другій групі, можуть свідчити про сильний прояв імунокорегуючої дії від БАР МП. У попередніх розділах було показано імуномодулюючу дію на імунну систему самиць, самців та їх приплід в різні періоди онтогенезу. Але ці тварини не були в імуносупресивному стані. Результати цього підрозділу доводять ефективність використання БАР МП при імуносупресивних станах, що може бути корисним у ветеринарії та в подальшому у медицині, для підвищення та модуляції імунної системи при різних захворюваннях інфекційного та неінфекційного характеру.

## ВИСНОВКИ

Розроблено та розширено комбінаторну бібліотеку стосовно біологічних та терапевтичних ефектів ГТ та її БАР.

Виявлено, що БАР МП належать до умовно не токсичних сполук, їх ЛД<sub>50</sub> при внутрічеревному введенні більше 3000 мг/кг, а при внутрішлунковому введенні ЛД<sub>50</sub> більше 5000 мг/кг.

Встановлені імуномодуляторні концентрації БАР МП *in vitro* (на культурі лейкоцитів) та *in vivo* (на організмі) у щурів в різних періодах онтогенезу.

Встановлено, що БАР МП при прямій їх дії на організм, стимулюють обидві ланки імунної системи (природжену та набуту), впливають на загальний морфогенез та гістогенез лімфоїдних органів не вагітних та вагітних тварин, їх приплід в різні періоди онтогенезу.

БАР МП не викликають тератогених ефектів, смертності, негативних побічних реакцій та відхилень від норми.

Виявлено, що при не прямому гірудологічному впливі проявляється виражена морфогенетична та імуномодуляторна дії у щурів та їх нащадків в постембріональному онтогенезі, яка відображається на організменому, тканинному та клітинному рівнях.

БАР МП здатні модулювати репродуктивну функцію тварин чоловічої статі до фізіологічних норм (збільшується загальна кількість сперматозоїдів та зменшуються їх дефекти, підвищується їх фертильність).

З'ясовано, що БАР МП здатні відновлювати імунну систему до первинного її стану при штучно створеному імуносупресивному стані.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Каменев, О. Ю.; Барановский, А. Ю. *Лечение пиявками: теория и практика гирудотерапии : руководство для врачей*; ИГ «Весь»: СПб, **2006**; с 108-114.
2. Амінов, Р. Ф., *Вплив гірудопунктури та екстракту з тканин медичної п'явки на імунну реактивність самиць та приплоду щурів у постембріональному онтогенезі* : дис. ... канд. біол. наук: 03.00.09., Київський національний університет, К., **2018**. 149.
3. Baskova, I. P., Hirudotherapy scientific basements. Humoral link. *Tula: Akvarius*, **2015**. 228.
4. Егорова, С. Н.; Гарифуллина, Г. Х., Фармацевтическое консультирование: пиявка медицинская (*Hirudo medicinalis*). *Медицинский вестник Башкортостана*, **2016**, 5, 19-24.
5. Коньртаева, Н. Н.; Иванов, С. В; Каусов, Г. К., и др. Гирудотерапия в Казахстане: контингент пациентов и приверженность к лечению. *Экология человека*. **2016**, 2, 42-48.
6. Dong, H.; Ren, J. X., Chinese medicinal leech: ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacological activities. *Evid based complement alternat med.*, **2016**, 7895935.
7. Крашенюк, А. И.; Крашенюк, С. В.; Чалисова, Н. И изобретатели; Крашенюк А. И, Крашенюк С. В, Чалисова Н. И, патентообладатели. Способ моделирования влияния медицинской пиявки на стимуляцию роста нервных волокон в культуре ткани. Патент России на изобретение. № 96105336/14. **2000** січень 20.
8. Литвиненко, Р. О., *Імуномодуляторні властивості біологічно активних речовин медичної п'явки в умовах гірудовпливу* : дис. ... канд. біол. наук: 03.00.09., Київський національний університет, К., **2016**. 169.
9. Wüstenhagen, D. A.; Lukas, P.; Müller, C., *et al.*, Cell-free synthesis of the hirudin variant 1 of the blood-sucking leech *Hirudo medicinalis*. *Scientific Reports*, **2020**, 10, 19818. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76715-w>.

10. Baranzini, N.; Weiss-Gayet, M.; Chazaud, B. et al., Recombinant *Hv*RNASET2 protein induces marked connective tissue remodelling in the invertebrate model *Hirudo verbana*. *Cell and Tissue Research*, **2020**, 380, 565–579. URL: <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03174-0>.
11. Kabeiseman, E.; Paulsen, R.; Burrell, B. D., Characterization of a monoacylglycerol lipase in the medicinal leech, *Hirudo verbena*. *Biochemistry and Molecular Biology*, **2020**, 243–244, 110433
12. Фролов, В. М.; Гарник, Т. П.; Пересадин, Н. А.; Высоцкий, А. А., Динамика показателей фагоцитарной активности моноцитов периферической крови у больных с синдромом психоэмоционального выгорания при гирудотерапии. *Український медичний альманах*, **2008**, 4(11), 175-178.
13. Григорьева, Д. В.; Горудко, И. В.; Графская Е. Н.; Лацис И. А.; Соколов А. В.; Панасенко О. М.; Лазарев В. Н., Влияние новых антимикробных пептидов на функциональную активность белков гранул нейтрофилов. *Медицинский академический журнал*, **2021**, 21(3), 49-62.
14. Baranzini, N.; De, V.A.; Orlandi, V.T.; Reguzzoni, M.; Monti, L.; de Eguileor M.; Rosini, E.; Pollegioni, L.; Tettamanti, G.; Acquati, F.; Grimaldi, A. Antimicrobial Role of RNASET2 Protein During Innate Immune Response in the Medicinal Leech *Hirudo verbana*. *Front. Immunol.*, **2020**, 11, 1-18. URL: [https://doi: 10.3389/fimmu.2020.00370](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00370).
15. Савинов, В. А.. Гирудотерапия : руководство; Медицина: Москва, **2004**; с 270-288.
16. Зельоний, І. І., Кузнецова, Л. В., Фролов, В. М., Пересадин, М. О., Вплив гірудотерапії на показники цитокінового профілю крові у хворих на рецидивуючу бешиху на тлі варикозної хвороби вен гомілки. *Український медичний альманах*, **2010**, 1(13), 52-55.
17. Фролов, А. К.; Токаренко, А. И., Изменения иммунитета у больных гипертонической болезнью под влиянием биологически активных веществ медицинской пиявки. *Запорожский медицинский журнал*, **2011**, 2(13), 23-26.

18. Волощенко Л. Г, Хабаров А. С, Зяблицкая Н. К, Шойхет Я. Н, винахідники; Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Алтайский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию", патентообладатели. Способ лечения хронического тонзиллита у больных с иммунодефицитным состоянием. Патент России на изобретение. № 2009108832/14. **2010** червень 20.
19. Спицына В. И. Иммунные нарушения и патогенетическое обоснование их коррекции у больных хроническими заболеваниями слизистой оболочки полости рта. Дисертація канд. мед. наук, Государственное образовательное Учреждение Институт повышения квалификации Федерального Управления, **2005**.
20. Глагович, М. В., *Лапаростомія та гірудотерапія в комплексному лікуванні перитоніту у дітей* : автореф. дис . ... канд. мед. наук: 14.01.09., Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ, **2006**. 19 .
21. Захарова, О. А., *Патогенетическое обоснование гирудотерапии у больных суставной формой ревматоидного артрита* : дис. ... канд. мед. наук: 14.00.16., ГОУВПО "Читинская государственная медицинская академия", Чита, **2008**. 155.
22. Cheng, B.; Liu, F.; Guo, Q.; Lu, Y.; Shi, H.; Ding, A.; Xu, C., Identification and characterization of hirudin-HN, a new thrombin inhibitor, from the salivary glands of *Hirudo nipponia*. *Peer J*, **2019**, 7, e7716. URL: <http://doi.org/10.7717/peerj.7716>.
23. Бургонский, В.Г.; Юркина, А.В., Применение гирудотерапии в практической стоматологии. *Современная стоматология*, **2016**, 1, 7-14.
24. Жулебина, Н.Н., Гирудотерапия в дерматологии. *Bulletin of Medical Internet Conferences*, **2017**, 7: 972.
25. Хардииков, А. В.; Сухов, К.В., Гирудотерапия в лечении склероатрофического лишена вульвы у женщин. *Трудный пациент*, **2021**, 6(19), 32-35.
26. Karadag, A.S.; Calka, O.; Akdeniz, N. A., case of irritant contact dermatitis with leech. *Cecen I Cutan Ocul Toxicol*, **2011**, 30, 234-235.

27. Агакишиев, Д. Д.; Гаджиева, А. Т.; Гусейнов, Р. Р., Эффективность гирудотерапии при лейомиоме кожи. *Вестник последипломного образования*, **2006**, 3-4, 36-37.
28. Kumar, S.A., Anti inflammatory effect of leech therapy in the patients of psoriasis (ek kustha). *J. Pharmaceut and Sci. Innovat.*, **2012**, 1(1), 71-74
29. Сенчукова, С. Р.; Журавлева, Т. А., Динамика индекса PASI больных псориазом при комплексном лечении с использованием гирудотерапии. *Фундаментальные исследования*, **2012**, 8(1), 149-152.
30. Кузнецова, Л.П.; Люсов, В.А.; Волов, Н.А.; Смирнова, Н.А.; Богданова, Л.С., Место гирудотерапии в комплексном лечении хронической сердечной недостаточности. *Российский кардиологический журнал*, **2008**, 2, 28-30.
31. Vallejo, J.R.; González, J.A., The medical use of leeches in contemporary spain: between science and tradition. *Acta med-hist Adriat*, **2015**, 13(1), 131-158.
32. Savrun, A.; Bozkurt, S.; Okumu, M.; Gokcen, E.; Turkaslan, M. Prolonged bleeding on the neck in leech therapy:case report. *Arch Clin Exp Surg (ACES)*, **2015**, 4, 234–237.
33. Кузнецова, Л.В.; Фролов, В.М.; Пересадин, М.О.; Круглова, О.В. Сучасні підходи до гірудорефлексотерапії при захворюваннях серцево–судинної системи. *Український морфологічний альманах*. **2010**, 8(1), pp. 32-35..
34. Белецкая, Т.А.; Комаровских, Е.Н., Возможности гирудотерапии в лечении больных первичной открытоугольной глаукомой. *Глаукома*, **2007**, 4, 23-27.
35. Hu, B.; Xu, L.; Li, Y.; Bai, X.; Xing, M.; Cao, Q. A peptide inhibitor of macrophage migration in atherosclerosis purified from the leech *Whitmania pigra*. *J Ethnopharmacol*, **2020**, 254, 112723. URL: <https://doi.10.1016/j.jep.2020.112723>.
36. Hosseinirad, S.A.; Yaghoubi, G.; Haidari, B., Misdiagnosis of Ocular Leech Infestation. *Journal of surgery and trauma*, **2017**, 5(1-2), 36-38.
37. Surendranth, D., et al. Role of Leeches in Peri-orbital lacerations healed by primary intention. *International Journal of Ayurvedic Medicine*, **2016**, 7 (1), 88-93.

38. Huang, H.; Ruxue, L.; Li, Y.; Huang, Q.; Gao, N.; Zou, W., Hirudo (Leech) for proliferative vitreous retinopathy A protocol for systemic review and meta-analysis. *Medicine*, **2021**,100, 1-5.
39. Самойлов, А.Н.; Зиганшин, А.У.; Егоров, Е.А., Экспериментальные и клинические предпосылки для применения препарата Пиявит в офтальмологии. *Офтальмология*, **2006**, 3(2), 65-66.
40. Борисенко, О.М.; Бедзик, О.В.; Міщанчук, Н.С., Гірудотерапія при комплексному лікуванні осіб з гострою сенсоневральною приглухуватістю. *Журнал вушних, носових і горлових хвороб*, **2005**, 3, 80-83.
41. Міщанчук, Н.С., Гірудотерапія при гострій сенсоневральній приглухуватості та гострих вестибулярних порушеннях у ліквідаторів наслідків аварії на ЧАЕС з фібринолітичними змінами. *Журнал вушних, носових і горлових хвороб*, **2005**, 2, 13-18.
42. Щетініна, О.О., *Лікування гострої та хронічної патології вуха із застосуванням медичної п'явки Hirudo medicinalis та лікарських засобів на її основі* : автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.19., Академія медичних наук України Інститут отоларингології ім. Проф. О.С. Коломійченка, Київ, **2001**. 19.
43. Кузьміна, М.Б., *Гирудотерапия экссудативного среднего отита у детей* : дис. ... канд. мед. наук: 14.00.04., Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Оренбургская государственная медицинская академия федерального агентства здравоохранению и социальному развитию, Оренбург, **2006**. 154.
44. Флаум, Р.А.; Шахов, А.В., Применение гирудорефлексотерапии в лечении пациентов с заболеваниями внутреннего уха. *Медицинский альманах*, **2008**, 2, 63-65.
45. Беляков, К.М.; Велиичко, Л.А.; Профьев, А.Л.; Смирнов, А.А., Опыт сочетанного применения мануальной и гирудотерапии при дискогенных пояснично-крестцовых радикулопатиях. *Мануальная терапия*, **2008**, 4, 47-50.



46. Michalsen, A.; Klotz, S.; Lüdtke, R.; Moebus, S.; Spahn, G.; Dobos, G.J., Effectiveness of leech therapy in osteoarthritis of the knee: A randomized, controlled trial. *Ann. Intern. Med.*, **2003**, *139*, 724-725.
47. Абдувалиев, А.А., Гирудотерапия в комплексном лечении больных реактивным артритом. *Лікарська справа*, **2003**, *2*, 42-45.
48. Абдувалиев, А.А.; Дауреханов, А.М., Гирудотерапия в комплексном лечении больных реактивным артритом. *Вестник КазНМУ*, **2017**, *1*, 250-252.
49. Васильева, Е.А.; Кобрин, В.И., Патофизиологическое обоснование применения метода гирудотерапии в клинике шейного и шейно-грудного остеохондроза у детей и подростков. Инновации в медицине: материалы I международной дистанционной научной конференции. Курск, **2008**, 47-48.
50. Мосиянц, Г.Г.; Лиев, А.А.; Куликовский, Б.Т., Сочетанное применение мануальной терапии и гирудорефлексотерапии при остеохондрозе поясничного отдела позвоночника. *Міжнародний неврологічний журнал*, **2009**, *3*, 43-44.
51. Michalsen, A.; Lüdtke, R.; Cesur, O.; Afra, D.; Musial, F.; Baecker, M.; Fink M.; Dobos, G.J., Effectiveness of leech therapy in women with symptomatic arthrosis of the first carpometacarpal joint: a randomized controlled trial. *Pain*, **2008**, *137*(2), 452-459.
52. Харенко, В.Н.; Фролов, В.А., К вопросу о развитии вертебрально-базилярной недостаточности в свете венозного дисциркуляторного механизма и некоторых особенностях применения мануальной терапии и гирудотерапии в ее профилактике и лечении. *Мануальная терапия*, **2007**, *2*, 47-55.
53. Лабінський, П.А., Ефективність нетрадиційних методик лікування хронічної судинної патології головного мозку. *Практична медицина*, **2008**, *1*, 36-39.
54. Хинчагов, Б.П.; Айвазов, В.Н.; Леонов, В.Л.; Константиновская, Г.И. и др., Эффективность и безопасность гирудотерапии при ишемических и цереброваскулярных заболеваниях. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*, **2008**, *4*, 55-60.

55. Добрынин, Ю.В., и др. Оценка эффективности секрета слюны пиявки в лечении цереброваскулярной и гинекологической патологии. *Вестник новых медицинских технологий*, **2008**, 15(1), 96-97.
56. Морозова, С.В.; Аксенова, О.В., Гирудотерапия в лечении периферических кохлеовестибулярных нарушений сосудистого генеза. *Вестник оториноларингологии*, **2009**, 4, 51-53.
57. Babenko, V.V.; Podgorny, O.V.; Manuvera, V.A.; Kasianov, A.S.; Manolov, A.I.; Grafaskaia, E.N., Draft genome sequences of *Hirudo medicinalis* and salivary transcriptome of three closely related medicinal leeches. *BMC genomics*, **2020**, 21(1), 1-16. URL: <https://doi.10.1186/s12864-020-6748-0>.
58. Добрынина, И.Ю.; Живогляд, Р.Н.; Хадарцева, К.А.; Шипилова, Т.Н., Гирудотерапевтическое управление гомеостазом человека при гинекологических патологиях в условиях Севера. *Вестник новых медицинских технологий*, **2005**, 12(2), 25-27.
59. Баймурадова, С.М., Гирудотерапия в профилактике у пациентов с синдромом потери плода и тромбофилией. *Аспирант и соискатель*, **2005**, 3(28), 136-139.
60. Сорокина, А.В., Гирудотерапия в гинекологической практике. *Медицинская сестра*, **2008**, 7, 19-20.
61. Wollina, U.; Heinig, B.; Nowak, A., Medical leech therapy (Hirudotherapy). *Our Dermatol Online*, **2016**, 7(1), 91-96.
62. Rehman, S., Management of Diabetic Foot Ulcer by *Hirudo medicinalis*, the “Healing Leech”. *Diabetic Foot Ulcer*, **2020**, 315-330.
63. Li, W.L.; Zheng, H.C.; Bukuru, J.; De Kimpe, N., Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology*, **2004**, 1, 1– 21.
64. Lauche, R.; Cramer, H.; Langhorst, J.; Dobos, G., A systematic review and metaanalysis of medical leech therapy for osteoarthritis of the knee. *Clin J Pain*, **2014**, 30, 63e72.
65. Yang, F.; Li, Y.; Guo, S.; Pan, Y.; Yan, C.; Chen, Z., *Hirudo* lyophilized powder ameliorates renal injury in diabetic rats by suppressing oxidative stress and

- inflammation. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, **2021**, 1-12. URL: <https://doi.org/10.1155/2021/6657673>
66. Tashiro, K.; Fujiki, M.; Arikawa, M.; Kagaya, Y.; Miyamoto, S., Free flap salvage after recurrent venous thrombosis by means of large-scale treatment with medical leeches. *Plast Reconstr Surg Glob Open*, **2016**, 4, e1157.
67. Porshinsky, B.S.; Saha, S.; Grossman, M.D. Clinical uses of the medicinal leech: a practical review. *J. Postgrad. Med.* **2011**, 57, pp. 65–71.
68. Ahmad, T.; Anwar, M. Clinical importance of Leech therapy. *Indian J. Tradit. Know.* **2009**, 8, pp. 443–445.
69. Niqar, Z.; Alam, M.A. Effect of taleeq (leech therapy) in dawali (varicose veins). *Anc. Sci. Life.* **2011**, 30, pp. 84–91.
70. Pospelova, M.L.; Barnaulov, O.D. Hirudotherapy in the treatment of bilateral internal carotid artery occlusion : case report. *Curr. Top. Neurol. Psychiatr. Relat. Discip.* **2010**, 18, pp. 51–53.
71. Prakash, A.; Parikshit, D.; Arun, G.R. Raj A review on the role of jalaukavacharana (hirudotherapy) in the management of the venous ulcer. *Universal Journal of Pharmacy.* **2013**, 2(4), pp. 38-43.
72. Махова, Е.В., Особенности лечения варикозного расширения вен пиявками. *Научный альманах*, **2015**, 11-4(13), 107-109.
73. Абдуллаева, А.И.; Божедомов, А.Ю.; Пустовая, Е.П.; Слонова, В.М.; Карнаева, А.С.; Кожевникова, Л.А., Применение гирудотерапии в комплексном лечении заболеваний пародонта. *Российский стоматологический журнал*, **2020**, 24(4), 273-277.
74. Абдуллаева, А. И.; Притыко, А. Г.; Воронин, П. А.; Михайлова, Е. Г., Анализ результата применения метода гирудотерапии при лечении хронического апикального периодонтита. *Вестник РГМУ*, **2020**, 3, 92-95.
75. Ткаченко, П.І., та ін. Гірудотерапія в комплексному лікуванні загострення хронічного паренхіматозного паротиту в дітей. *Український стоматологічний альманах*, **2006**, 3, 63–65.

76. Зубкова, Л.П., и др., Применение гирудотерапии в стоматологии. *Український стоматологічний альманах*, **2007**, 1, 13–15.
77. Блинова, О.А., и др., Пленки с препаратом медицинской пиявки. *Фармація*, **2005**, 2, 18–20.
78. Herlin, C., et al., Leech therapy in flap salvage: systematic review and practical recommendations. *Ann Chir Plast Esthet.*, **2017**, **62**, 1–13.
79. Попов, Н.С., и др., Морфологические изменения в коже крыс при наружном применении экстракта пиявки медицинской при термическом ожоге. *Верхневолжский медицинский журнал*, **2014**, 12(2), 45-50.
80. Valerio, E., et al., Use of *Hirudo medicinalis* in paediatric reconstructive surgery. *Arch Dis Child Educ Pract Ed.*, **2017**, 1–2.
81. Митрофанов, И.В., Гирудотерапия в комплексном лечении пародонти. *Вестник новых медицинских технологий*, **2006**, 13(1), 100.
82. Jha, K., et al., Hirudotherapy in medicine and dentistry. *J Clin Diagn Res*, **2015**, 9(12), ZE05- ZE07.
83. Thakur, I., et al., Hirudotherapy in dentistry. *Int J Oral Health Sci.*, **2016**, 6, 65–69.
84. Krashenyuk ,A.I., “Neurotrophic (Neural Stimulating) and Neuromediator Effects of *Hirudo medicinalis*. Pathogenetic Mechanism of Treatment of Diseases of the Nervous System of the Human”. *Acta Scientific Medical Sciences*, **2020**, 4(3), 4-9.
85. Верещак, О.В., Диференційоване застосування гірудотерапії в комплексному лікуванні алкогольної та опіюїдної залежності : автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.17., Академія медичних наук України Інститут неврології, психіатрії та наркології, Харків, **2007**. 20.
86. Зубаркина, М.М.; Жернов, В.А., Коррекция методом гирудотерапии нейропсихологических нарушений у больных истинной полицитемией. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*, **2009**, 1, 95–97.
87. Wang, J-S.; Li, Xiao; Chen, Z-L., Effect of leech-centipede medicine on improving erectile function in DIED rats via PKC signalling pathway-related molecules.

*Journal of Ethnopharmacology*, **2020**, 267, 113463,  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113463>

88. Kalender, M.E., Leech therapy for symptomatic relief of cancer pain. *Pain Med*, **2010**, 11, 443–445.
89. Ouyang, L-D.; Hu, X-S.; Niu M., Mechanisms of Hirudo in promoting blood circulation and removing stasis based on network pharmacology. *China journal of Chinese materia medica*, **2018**, 43(09), 1901-1906.
90. Liubov B-N., Medicinal properties of leeches. Israel: B. N. Publication House, **2020**, 94.
91. Bank, J., Medicinal leech fixation in precarious locations. *J. Reconstr. Microsurg*, **2008**, 24, 67–68.
92. Frodel, J.; Barth, P.; Wagner, J., Salvage of partial facial soft tissue avulsions with medicinal leeches. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, **2004**, 131, 934-939.
93. Hullett, J.S.; Spinnato, G.G.; Ziccardi, V., Treatment of an ear laceration with adjunctive leech therapy: a case report. *J. Oral. Maxillofac. Surg.*, **2007**, 65, 2112–2114.
94. Mineo, M.; Jolley, T.; Rodriguez, G., Leech therapy in penile replantation : a case of recurrent penile selfamputation. *Urology*, **2004**, 63, 981–983.
95. Chepeha, D.B., et al., Leech therapy for patients with surgically unsalvageable venous obstruction after revascularized free tissue transfer. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, **2002**, 128, 960–965.
96. Сухов, К.В., Клиническая гирудотерапия: практическое руководство. М. : Accent Graphics Communications, Ottawa, **2018**. 160.
97. Butt, A.M., et al., Leech therapy for the treatment of venous congestion in flaps, digital re-plants and revascularizations – a two-year review from a regional centre. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, **2016**, 28(2), 219–223.
98. Aldemir, C.; Duygun, F., When and how should leeches be applied in cases of venous congestion?. *International Medical Journal. Medicine Science*, **2017**, 6(1), 1- 4.

99. Whitaker, I., et al., Characterization of the digestive tract microbiota of *Hirudo orientalis* (Medicinal Leech) and antibiotic resistance profile. *Plastic and Reconstructive Surgery*, **2014**, *133*(3), 408e-18e.
100. Shakouri A.; Kahroba, H.; Hamishekar, H.; Abdolalizadeh, J., Nanoencapsulation of *Hirudo medicinalis* proteins in liposomes as a nanocarrier for inhibiting angiogenesis through targeting VEGFA in the Breast cancer cell line (MCF-7). *BioImpacts*, **2021**, *11*(5), x-x URL: <https://doi: 10.34172/bi.2021.39>.
101. Abdullah, S., et al., Hirudotherapy / Leech therapy: applications and indications in surgery. *Arch. Clin. Exp. Surg.*, **2012**, *1*(3), 172–180.
102. Abdualkader, A.M., et al., Leech therapeutic applications. *Indian. J. Pharm. Sci*, **2013**, *75*(2), 127-37.
103. Okka, B., Hirudotherapy from past to present. *Eur. J. Basic. Med. Sci.*, **2013**, *3*(3), 61-65.
104. Singh, A.P., Medicinal leech therapy (hirudotherapy): a brief overview. *Complement. Ther. in Clin. Pract.*, **2010**, *16*, 213215.
105. Houschyar, K.S.; Momeni, A.; Maan, Z.N., Medical leech therapy in plastic reconstructive surgery. *Wien Med Wochenschr.*, **2015**, *165*(19-20), 419-425.
106. Koeppen, D.; Aurich, M.; Rampp, T., Medicinal leech therapy in pain syndromes: a narrative review. *Wien. Med. Wochenschr.*, **2014**, *164* (5-6), 95-102.
107. Zulhisyam, A.K., et al., Local (Malaysian) leech as alternative healing treatment and an islamic perspective. *International Journal of Islamic Thought.*, **2016**, *10*, 68-77.
108. Ji, Y.; Li, L.; Wu, M.H., Research progress in the studies on antitumormechanisms of leech. *Chinese Journal of Information on Traditional. Chinese Medicine*, **2015**, *22*(3), 131–133.
109. Amani, L .; Motamed , N .; Mirabzadeh, A. M.; Dehghan, S. M.; Malek, M., et al., Semi-Solid Product of Medicinal Leech Enhances Wound Healing in Rats. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.*, **2021**, *16*(4), e113910. URL: <https://doi: 10.5812/jjnpp.113910>.

110. Liu, J.; Sui, Y., Effects of leech superfine powder on the level of serum lipid in the rabbit of atherosclerosis model. *Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, **2015**, 17(6), 26–28.
111. Yu, G., et al., Combination effects of antimicrobial peptides. *Antimicrob agents chemother*, **2016**, 60(3), 1717 - 1724.
112. Лялина, Е.Г., Сочетанное применение гирудотерапии, рефлексотерапии и гомеопатии в лечении женского бесплодия. *Психосоматические и интегративные исследования*, **2016**, 2, 0207.
113. Stokoz, K.Yu.; Bystritskaya, T.S., Leech therapy in women with a history of primary oligomenorrhea. *Амурский медицинский журнал*, **2016**, 3 - 4 (15 - 16), 106-108.
114. Sayed, A.A.; Sadeq, R.; Mojtaba, T., Leech Therapy for Treating Priapism: Case Report Iran. *J Public Health.*, **2017**, 46(7), 985-988.
115. Zaidi, S.M.; Jameel, S.S.; Zaman, F.; Jilani, S.; Sultana, A.; Khan, S.A., A systematic overview of the medicinal importance of sanguivorous leeches. *Altern med rev.*, **2011**, 16(1), 59-65.
116. Das, B., An overview on hirudotherapy/leech therapy. *Ind Res J Pharm Sci.*, **2014**, 1(1), 33–45.
117. Sobczak, N.; Kantyka, M., Hirudotherapy in Veterinary Medicine. *Annals of parasitology*, **2014**, 60(2), 89–92.
118. Каменев, О.Ю., Новая технология получения биологически активной добавки из тканей медицинской пиявки для косметических и лечебных средств. *Труды Кубанского государственного аграрного университета*, **2008**, 10, 114–117.
119. Zavalova, L.L., et al. Antibacterial nonglycosidase activity of invertebrate destabilase-lysozyme and of its helical. amphipathic peptides. *Chemotherapy*, **2006**, 52, 158-160.
120. Баскова, И.П.; Завалова, Л.Л., Полифункциональность дестабилазы-лизоцима из медицинской пиявки. *Биоорганическая химия*. **2008**, 34(3), 337–343.

121. Junren, C.; Xiaofang, X.; Huiqiong, Z.; Gangmin, L.; Yanpeng, Y.; Xiaoyu, C.; Yuqing, G.; Yanan, L.; Yue, Z.; Fu, P.; Cheng, P., Pharmacological Activities and Mechanisms of Hirudin and Its Derivatives - A Review. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 660757. URL: <https://doi: 10.3389/fphar.2021.660757>.
122. Abbas Zaidi, S.M., et al. A systematic overview of the medicinal importance of sanguivorous leeches. *Altern. Med. Rev.*, **2011**, *16*(1), 59–65.
123. Dhainaut, A.; Scaps, P.; Dhainaut, A., Immune defense and biological responses induced by toxics in Annelida. *Can. J. Zool.*, **2001**, *79*, 233–253.
124. Жернов, В.А.; Зубаркина, М.М., Восстановительная медицина. Гирудотерапия: уч.-метод. пособ. М.: Изд-во РУДН, **2004**. 53.
125. Lu, J.; Chen, X.; Xu, X., et. al., Active polypeptides from *Hirudo* inhibit endothelial cell inflammation and macrophage foam cell formation by regulating the LOX-1/LXR- $\alpha$ /ABCA1 pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **2019**, *115*, 108840. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108840>
126. Joslin, J.; Biondich, A.; Walker, K.; Zanghi, N., A comprehensive review of hirudiniasis: from historic uses of leeches to modern treatments of their bites. *Wilderness & environmental medicine*, **2017**, *28*, 355–361.
127. Никонов, Г.И.; Крыжановский, С.А.; Лебедева А.О. Влияние экстракта медицинских пиявок на течение острого экспериментального инфаркта миокарда у крыс. *Экспериментальная кардиология*, **2015**, *6*(4), 28-29.
128. Ojo, P.O.; Babayi, H.; Olayemi, I.K.; Peter, O.O.; Fadipe, L.A.; Baba, E.; Izebe, K., Anti-Tubercular Activities and Molecular Characterization of Salivary Extract of Leech (*Hirudo medicinalis*) against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Tuberculosis Research*, **2018**, *6*, 1-9.
129. Grumbine, N.A.; Nicholas, A. Feature: reviving an ancient therapy to manage chronic pain. *Podiatry Today*, **2003**, *16*, 46–53.
130. Lee, Y.C.; Chiu, C.J., Ocular leech infestation. *Clin Ophthalmol*, **2015**, *9*, 419–421.
131. Фролов, О.К., та ін. Вплив екзогенних біологічно активних речовин медичної п'явки на біологічні властивості *Escherichia coli* 3912/41. *Мікробіологія і біотехнологія*, **2014**, *2*(26), 94-100.



132. Frolov, A.K., et al., Influence of biologically active substances of medicinal leech on opportunistic and saprophytic microflora. European Science and Technology: materials of the III international research and practice conference, Vol. II, Munich, October 30th–31st, 2012, Vela Verlag Waldkraiburg – Munich – Germany, **2012**, 570-575.
133. Müller, C.; Lukas, P.; Sponholz, D.; Hildebrandt, J-P. The hirudin-like factors HLF3 and HLF4—hidden hirudins of European medicinal leeches. *Parasitology Research*. **2020**, *119*, pp.1767–1775. URL: <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06697-1>.
134. Müller C.; Mescke K.; Liebig S.; Mahfoud H.; Lemke S.; Hildebrandt J.-P., More than just one: multiplicity of hirudins and hirudin-like factors in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*. *Mol. Gen. Genomics*, **2016**, *291*(1), 227–240.
135. Нерянова, Ю. Н.; Кузьменко, Л. В., Опыт применения гирудотерапии в комплексном лечении головокружения у больных дисциркуляторной энцефалопатией. *Запорожский медицинский журнал*, **2014**, *2*(83), 48-50.
136. Yang, K.; Fan, B.; Zhao, Q.; Ji, Y.; Liu, P.; Gao, S.; Ren, T.; Dou, Y.; Pei, M.; Yang H. Hirudin ameliorates renal interstitial fibrosis via regulating TGF- $\beta$ 1/Smad and NF- $\kappa$ B Signaling in UUO Rat Model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2020**, *9*.
137. Kabeisemana, E.; Paulsena, R.; Brian, D., Characterization of a monoacylglycerol lipase in the medicinal leech, *Hirudo verbena*. *Burrella Comparative Biochemistry and Physiology*, **2012**, 243–244
138. Herlin, C.; Bertheuil, N.; Bekara, F., Leech therapy in flap salvage: systematic review and practical recommendations. *In Annales de Chirurgie Plastique Esthétique. Elsevier Masson*, **2017**, *62*(2), 1–13.
139. Das, B., An overview on hirudotherapy/leech therapy. *Ind Res J Pharm Sci*. **2014**, *1*(1), 33–45.
140. Davis, A.; Mejia, P.; Lu, F., Biological activities of C1inhibitor. *Molecular immunology*, **2008**, *45*(16), 4057–4063.

141. Indergand, S.; Graf, J., Ingested blood contributes to the specificity of the symbiosis of *aeromonas veronii* biovar *sobria* and *Hirudo medicinalis*, the medicinal leech. *Applied and environmental microbiology*, **2000**, 66(11), 4735–4741.
142. Kashuba, E.; Bailey, J.; Allsup, D., et al. The kinin-kallikrein system: physiological roles, pathophysiology and its relationship to cancer biomarkers. *Biomarkers*, **2013**, 18(2), 279–296.
143. Clarke, C. E., Medical therapeutics derived from leeches (Phy. Annelida; Cl. Hirudinea). *MacEwan University Student eJournal*, **2017**, 3(1), 211-223.
144. Caughey, G. H., Mast cell proteases as pharmacological targets. *European journal of pharmacology*, **2016**, 778, 44–55
145. Kumar, V.; Abbas, A.; Fausto, N.; Jon, A., Robbins and Cotran pathologic basis of disease. *Philadelphia: Elsevier health sciences*, **2014**. 1464.
146. 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*, **2008**, 73(3), 315–320.
147. Darestani, K. D.; Mirghazanfari, S. M.; Moghaddam, K. G., et al. Leech therapy for linear incisional skin-wound healing in rats. *Journal of acupuncture and meridian studies*, **2014**, 7(4), 194–201.
148. Rahul, S.; Swarnasmita, P.; Janhavi D., et al. Hirudotherapy-a holistic natural healer: a review. *LEECH*, **2014**, 2(6), 60-61.
149. Gronwald, W.; Bomke, J.; Maurer, T., et al. Structure of the leech protein saratin and characterization of its binding to collagen. *Journal of molecular biology*, **2008**, 381(4), 913–927
150. Shiffa, M., et al. Leech therapy in knee osteoarthritis: mechanism and effects. *Int. J. Univers. Pharm. Life Sci.*, **2012**, 2(3), 40–49
151. Фролов, А., и др. Влияние гирудотерапии на физиологические показатели у коз. *Тваринництво України*, **2010**, 7, 7–10

152. Касянчук, В.; Иванникова, О.; Марченко, А., Визначення субклінічного маститу у корів з використанням морфофункціональних показників вимені і математичного моделювання. *Тваринництво України*, **2009**, 9, 24–28.
153. Лукоянова, Л.А., Патогенетическое обоснование использования гирудотерапии при интоксикационном синдроме у собак : дис. ... канд. вет. наук: 16.00.02., Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины, СПб., **2009**. 130.
154. Попов, Л.К.; Долгова, С.А.; Попова, И.С., Гирудопунктура при эндометрите у собак. *Ветеринария*, **2008**, 10, 55–56.
155. Лукоянова, Л.А.; Крячко, О.В., Влияние гирудотерапии на некоторые гематологические и биохимические показатели при интоксикационном синдроме у собак. *Ветеринарная практика*, **2009**, 1(44), 39-43.
156. Canpolat, İ.; Sağlam, N., Treatment of diffuse hematoma in a dog with the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*. *Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları*, **2004**, 2 (2), 97–99.
157. Ayhan, H.; Carhan, A.; Mollahaliloglu, S., Medical leech therapy. International DNA day and genome congress, april 24-28, Kirsehir, Turkey, **2017**, 137.
158. Trenholme, H. N.; Masseur I. ; Reiner C.R., Hirudotherapy (medicinal leeches) for treatment of upper airway obstruction in a dog. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, **2021**, 31(5), 661-667.
159. Рычапова, Л.С., Опыт применения гирудотерапии при эндометритах у кошек и собака. *Успехи современной науки и образования*, **2017**, 6(3), 182-185.
160. Попова, И.С., Воспроизводительная способность молочных коров разных генотипов и использование гирудопунктуры для ее коррекции : автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.07., Воронеж. гос. аграр. ун-т им. К.Д. Глинки, Воронеж, **2003**. 21.
161. Демидчик, Л.Г., Гирудотерапия при скрытом мастите коров. *Ветеринария. Реферативный журнал*, **2001**, 2, 441.

162. Петров, А.Н., Разработка и изучение механизмов действия гирудотерапии при мастите у коров : автореф. дис. ... канд. биол. наук: 16.00.04., Мичуринский государственный аграрный университет, Воронеж, 2000. 27.
163. Романова, Е.М.; Климина, О.М.; Козлова, Л.А., Применение гирудотерапии и гирудоакупунктуры при субклинической форме мастита у коров. *Ветеринарный врач*, **2008**, 4, 35–37.
164. Кондратьева, М.М.; Сидорова, К.А.; Глазунова, Л.А., Влияние гирудина на гематологические показатели у коров при субклиническом мастите. *Сельскохозяйственные науки*, **2015**, 3(30), 58-63.
165. Глазунова, Л. А.; Анодина, М. М., Гирудотерапия при лечении субклинических маститов у коров. *Современные проблемы науки и образования*, **2013**, 6, 1060.
166. Геращенко, Л. *Всё о пиявке. Гирудотерапия для разных типов людей*; Питер: СПб, **2007**; с 170-178.
167. Zavalova, L. L., et al., Antibacterial nonglycosidase activity of invertebrate destabilase-lysozyme and of its helical. Amphipathic peptides. *Chemotherapy*, **2006**, 52, 158-160.
168. Singh, A. P., Medicinal leech therapy (hirudotherapy): a brief overview. *Complement Ther Clin Pract*, **2010**, 16(4), 213-215. URL: <https://doi.10.1016/j.ctcp.2009.11.005..>
169. Abdisa, T., Therapeutic importance of leech and impact of leech in domestic animals. *MOJ Drug Design Development & Therapy*, **2018**, 2(6), 235-242.
170. Abdullah, S.; Dar, L.; Rashid, A., et al., Hirudotherapy leech therapy: applications and indications in surgery. *Arch Clin Exp Surg.*, **2012**, 1(3), 172–180.
171. Leech therapy for symptomatic relief of cancer pain / M. E. Kalender et al. *Pain Med.*, **2010**, 11, 443–445.
172. Поспелова, М.Л., Гирудотерапия пациентов с хронической головной болью и депрессией. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*, **2017**, 10-1, 56-58.

173. Pavlova, I. B.; Yudina, T.G.; Baskova, I.P., Studying of prospects of use of the secret of salivary cages of the medical bloodsucker of *Hirudo medicinalis* and preparation «Piyavit» as the antimicrobial complexes which aren't causing resistance in microorganisms. *Modern problems of science and education*, **2015**, 2.
174. Тюкин, О. А., Гирудотерапия: медико-социальный аспект. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*, **2016**, 9, 244-247.
175. Костикова, Л. И., Гирудотерапия: энциклопедия лечения медицинскими пиявками. М.: Э, **2018**. 512.
176. Станченко, А.О., Лікування рецидивуючих фурункулів носа : автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.19., Академія медичних наук України Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка, К., **2004**. 19.
177. World Health Organization. Clinical Management of Severe Acute Respiratory Infection When Novel Coronavirus (nCoV) Infection is Suspected: Interim Guidance. World Health Organization, Geneva. **2020**. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331446>.
178. Huang, C.; Wang, Y.; Li, X.; Ren, L.; Zhao, J; Hu, Y. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. **2020**, 395, pp. 497-506.
179. Calvi, E.; Bernardi, N.; Cimino, G.; Pascariello, G.; Faggiano, P.; Gavazzi E.; Vizzardi, E.; Metra, M. Unusual intracardiac thrombosis in two patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19): case series. *European Heart Journal - Case Reports*. **2020**, 1-7. URL: <https://academic.oup.com/ehjcr/advance-article/doi/10.1093/ehjcr/ytaa518/6054745>.
180. Clinical management protocol for COVID-19. Government of India Ministry of Health and Family Welfare. Version 6. URL: <https://www.mohfw.gov.in/pdf/PostCOVID13092020.pdf>.
181. Carfi, A.; Bernabei, R.; Landi, F.; Gemelli Against COVID-19 Post-Acute Care Study Group. Persistent symptoms in patients after acute COVID-19. *J. Am. Med. Assoc.* **2020**, 324, 603–605.

182. Tenforde; M.W. Symptom duration and risk factors for delayed return to usual health among outpatients with COVID-19 in a multistate health care systems network—United States, March–June 2020. *Morb. Mortal. Wkly Rep.* **2020**, *69*, 993–998.
183. Huang; C. 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study. *Lancet.* **2021**, *397*, 220–232.
184. Gupta, A. et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat. Med.* **2020**, *26*, 1017–1032
185. Amaral, C.M.; Lima O. Information about the new coronavirus disease (COVID-19). *Radiol Bras.* **2020**, *53*(2), 5–6. URL: <http://dx.doi.org/10.1590/0100-3984.2020.53.2e1>.
186. Tiwari, N.N.; Dudhamal, T.S.; Prasad, S.M.; Shah, R.K.; Patel, B.D.; Shah, B. Ayurveda and COVID 19 pandemic in Nepal. *Healer Journal*, **2020**, *1*(1), 1-5.
187. Жаров, Д.Г. *Секреты гирудотерапии или как лечиться пиявками*; Феникс: Ростов н/Д, **2003**, 180-196.
188. Коритнюк, Р.; Борисенко Т. Пиявочка–козявочка. *Фармацевт–практик*, **2009**, *1*, 34–37.
189. Долженко, М.М. Пацієнт молодого віку з Covid-19: у фокусі – серцево-судинні ускладнення та реабілітація. *Здоров'я України*, **2021**, *2*(495), 41-42
190. Baskova, I.P.; Zavalova, L.L. Proteinase inhibitors from the medicinal leech *Hirudo medicinalis*. *Biochemistry.* **2001**, *66*(7), 703-714. URL: <https://doi.10.1023/a:1010223325313>.
191. Baranzini, N.; Pulze, L.; Reguzzoni M.; Roncoroni R.; Orlandi V.T.; Tettamanti, G.; Acquati, F.; Grimaldi, A. 3D Reconstruction of H<sub>v</sub>RNA<sub>SET2</sub> Molecule to Understand Its Antibacterial Role. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9722; URL: <https://doi.10.3390/ijms21249722> 1-17.
192. Afroz, A.T.; Najar, F.A.; Faisal, M.; Fatima, M. Effect of Irsale Alaq (leech therapy) in thrombosed pile mass: a case study. *Int J Sci Rep.* **2020**, *6*(6), 220-222.

193. Кузнецова, Л. П.; Люсов, В.А.; Волов, Н.А. Место гирудотерапии в комплексном лечении хронической сердечной недостаточности. *Российский кардиологический журнал*. **2008**, 2, 28–30.
194. Свиридкина, Л. П.; Боровая, Е.П.; Махнева А.В. Гирудотерапия в комплексном санаторно-курортном лечении больных ишемической болезнью сердца. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*. **2008**, 3, 12–15
195. Джиоев, И.А.; Методика гирудотерапии при лечении венозных трофических язв нижних конечностей в условиях поликлиники. *Аспирант и соискатель*. **2006**, 4, 221–224
196. Гончарова, А. Эффективность гирудотерапии при заболеваниях сердечно-сосудистой системы. Збірник наукових праць міжнародної науково-практичної інтернет-конференції «Проблеми та перспективи розвитку науки на початку третього тисячоліття у країнах СНД». Переяслав-Хмельницький, 27 – 28 лютого, **2014**, 8-12. URL: <http://conferences.neasmo.org.ua/ru/art/142>
197. Крячко, О.В.; Лукоянова, Л.А. Влияние гирудотерапии на некоторые гематологические и биохимические показатели при интоксикационном синдроме у собак. *Ветеринарная практика*. **2009**, 1, 65–68.
198. Малий, В.П.; Асоян, І.М.; Сай, І.В.; Андрусович, І.В. Патогенез коронавірусної інфекції COVID-19. *Інфекційні хвороби*. **2020**, 3(101), 73-83.
199. Андрейчин, М.А.; Ничик, Н.А.; Завіднюк, Н.Г.; Йосик, Я.І.; Іщук, І.С.; Івахів О.Л. COVID-19: Епідеміологія, клініка, діагностика, лікування та профілактика. *Інфекційні хвороби*. **2020**, 2(100), 41-55. URL: <https://doi.org/10.11603/1681-2727.2020.2.11285>
200. Sudhadevi, M. Leech therapy: A holistic treatment. *International Journal of Advance Research in Nursing*. **2020**, 3(1), 130-132
201. Grafskaiia, E.N.; Nadezhdin, K.D.; Talyzina, I.A.; Polina, N.F.; Podgorny, O.V.; Pavlova, E.R. Medicinal leech antimicrobial peptides lacking toxicity represent a promising alternative strategy to combat antibiotic-resistant pathogens. *Eur J Med Chem*. **2019**, 180, 143-153. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.080>

202. Wilmer, A.; Slater, K.; Yip, J.; Carr, N.; Grant, J. The role of leech water sampling in choice of prophylactic antibiotics in medical leech therapy. *Microsurgery*. **2013**, 33(4), 301-304. URL: <https://doi.org/10.1002/micr.22087>
203. Malik, B.; Astuti, D.A.; Arief, D.J.F.; Rahminiwati M. A study on antioxidative and antimicrobial activities of saliva extract of Indonesian local leeches. *IOP Conf. Ser. Earth. Environ.* **2019**, 251, 1-16
204. Fattakhov, N.K.; Tilyakhodzhaeva, G.B., Abdulkhakimov A.R. Efficiency of application of hirudotherapy to have been having coronaviral infection. *Journal of applied research*. **2021**, 7(4), 2908-2911.
205. Merrill, J.T.; Erkan, D.; Winakur, J. Emerging evidence of a COVID-19 thrombotic syndrome has treatment implications. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2020**, 16(10), 581–589.
206. Whitsett, J.A.; Alenghat, T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat. Immunol.* **2015**, 16 (1), 27–35
207. Zhou, Z.; Ren, L.; Zhang, L. Overly Exuberant Innate Immune Response to SARS-CoV-2 Infection. *SSRN Electronic Journal*. **2020**, URL: <https://doi.org/10.2139/ssrn.3551623>
208. Zhou, Z.; Ren, L.; Zhang, L. Heightened Innate Immune Responses in the Respiratory Tract of COVID-19 Patients. *Cell Host Microbe*. **2020**, 27(6), 883–890.
209. Li, G.; Fan, Y.; Lai, Y. Coronavirus infections and immune responses. *J. Med. Virol.* **2020**, 92 (4), 424–432
210. Seif, F.; Khoshmirsafa, M.; Aazami, H. The role of JAKSTAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. *Cell Commun. Signaling*. **2017**, 15(1), 21-23
211. Juno, J.A.; Tan, H.-X.; Lee, W.S. Humoral and circulating follicular helper T cell responses in recovered patients with COVID-19. *Nat. Med.* **2020**, 26, 1427-1428
212. Herold, T.; Jurinovic, V.; Arnreich, C. Elevated levels of IL-6 and CRP predict the need for mechanical ventilation in COVID-19. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2020**, 146 (1), 128–136



213. Barnes, B.J.; Adrover, J.M.; Baxter-Stoltzfus, A. Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.* **2020**, *217*, e20200652
214. Cao, X. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20*(5), 269–270.
189. Maucourant, C.; Filipovic, I.; Ponzetta, A. Natural killer cell immunotypes related to COVID-19 disease severity. *Science Immunology.* **2020**, *5*(50), eabd6832
216. Cherneva, R.; Cherneva, Z.; Cherneva, R. V.; Cherneva, Z. V. Infection, inflammation and immunity in COVID-19 infection. *Scientific review.* **2021**, *3*, XLVIII, 77-82. URL: <https://doi.org/10.2478/AMB-2021-0040>
217. Хабаров, А.С.; Зяблицкая, Н.К.; Волощенко, Л.Г.; Шойхет, Я.Н. (Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Алтайский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию) Способ лечения хронического тонзиллита у больных с иммунодефицитным состоянием. Патент России 2391991, 20.06.2010.
218. Денискина, Е.В. Клинико-лабораторное обоснование гирудотерапии в комплексном лечении хронического верхушечного периодонтита. Диссертация канд. мед. наук, Московский государственный медико-стоматологический университет, **2003**.
219. Боровая, Е.П. Гирудотерапия и эндозкологическая реабилитация в комплексном санаторно-курортном лечении больных ишемической болезнью сердца среднего и пожилого Диссертация канд. мед. наук, Российский научно-исследовательский институт геронтологии, **2008**
220. Zheng, K.I.; Feng, G.; Liu, W- Y.; Targher, G.; Byrne, C.D.; Zheng M- H. Extrapulmonary complications of Covid- 19: A multisystem disease? *J Med Virol.* **2021**, *93*, 323–335. URL: <https://doi.org/10.1002/jmv.26294>
221. Ковальова, О.В.; Ковальова А.А.; Шкопинський Є.О.; Кошля О.В. Гірудотерапія як засіб фізичної реабілітації. *Естетична медицина.* **2013**, *2* (32), 18-23 .

222. Тараба Т.С. Гирудотерапия (часть 1): дефиниция, показания, противопоказания. *Вестник клинической больницы*. **2016**, *51*, 9-13.
223. Чоботар, А.І. Випадок бешихи після гірудотерапії. *Український журнал дерматології, венерології, косметології*. **2009**, *4* (35), 41-44.
224. Daye, M.; Işık, B.; Kılınc, F. Lichen planus due to hirudotherapy. *Turkiye parazitolojii dergisi*. **2021**, *45*(2), 149–152. URL: <https://doi:10.4274/tpd.galenos.2020.7066>
225. Hanner, S.; Stroh, H.; Enk, A.; Hoffmann, J. Cutaneous pseudolymphoma after hirudotherapy: Case report and review. *Der Hautarzt; Zeitschrift Fur Dermatologie, Venerologie, Und Verwandte Gebiete*. **2021**. URL: <https://doi:10.1007/s00105-021-04812-6>.
226. Curcio, A.; Lloyd, C.M. Leech me alone! Atraumatic hemarthrosis after hirudotherapy. *Cureus*. **2020**, *12*(2), e6915. URL: <https://doi:10.7759/cureus.6915>
227. Akalın, Ç.; Ekmen, N. Non-occlusive mesenteric ischemia due to hirudotherapy: a case report. *Cureus*. **2020**, *12*(7), e9467. URL: <https://doi:10.7759/cureus.9467..>
228. Kılıç, M.; Ak, R. Orbital cellulitis due to leech therapy. *Bulletin of emergency and trauma*. **2019**, *7*(3), 335–336. URL: <https://doi:10.29252/beat-0703020>
229. Çakmak, O.; Çaltekin, İ.; Gökçen, E.; Savrun, A.; Yaşar, E. Kounis syndrome due to hirudotherapy (leech therapy) in emergency department; a case report. *Turkish journal of emergency medicine*. **2018**, *18*(2), 85–87. URL: <https://doi:10.1016/j.tjem.2017.12.005>
230. Güven, R. Treatment of a patient in hemorrhagic shock due to leech bite with tranexamic acid. *The american journal of emergency medicine*. **2016**, *34*(11), 2253.e3–2253.e4. URL: <https://doi:10.1016/j.ajem.2016.05.021>
231. Sadati, M. S.; Rezaee, M.; Ghafarpur, S.; Aslani, F. S.; Dastgheib, L.; Jahankhah, R., "Cutaneous lymphoid hyperplasia induced by *Hirudo medicinalis* (leeches)" *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, **2019**, *16*(4), 20160056. URL: <https://doi.org/10.1515/jcim-2016-0056>
232. Gülyeşil, F.F.; Sabaner, M.C.; Duman, R.; Çetinkaya, E.; Duman, R., Periorbital cellulitis that developed after alternative medication of *Hirudo Medicinalis*

- Application. *Journal of Clinical & Experimental Ophthalmology*, **2017**, 8(2), 1000643. URL: <https://doi:10.4172/2155-9570.1000643>
233. Spear, M. Medicinal leech therapy: friend or foe. *Plastic Surgical Nursing: official journal of the american society of plastic and reconstructive surgical nurses*. **2016**, 36(3), 121–125. URL: <https://doi:10.1097/PSN.0000000000000152>
234. Maetz, B.; Abbou, R.; Andreoletti J.B. et al. Infections following the application of leeches: two case reports and review of the literature. *Journal of medical case reports*. **2012**, 6, 364. URL: <https://doi:10.1186/1752-1947-6-364>
235. Wang, E.W.; Warren, D.K.; Ferris, V.M.; , Pharm E.C.; Nussenbaum, B. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. **2011**, 137(2), 190-193. URL: <https://doi:10.1001/archoto.2010.257>
236. Antibiotic-resistant infections began after surgery. Were they transmitted by leeches? (англ.) ?. *STAT* (24 июля 2018). Дата обращения: 9 октября **2021**. URL: <https://www.statnews.com/2018/07/24/antibiotic-resistant-infections-leeches/>
237. Горбань, В.И.; Жукова, Н.С.; Сизова, О.Л.; Пичхидзе, С.Я., изобретатели; ООО НВФ Гируд И.Н., патентообладатель. Лечебный гель Пиявит+ на основе биологически активннх веществ, продуцируемых медицинской пиявкой, и способ его получения без лиофилизации. Патент России на изобретение. № 2004100547/15. **2006** январь 27.
238. Башева, Е.М., изобретатель; Башева Е.М., патентообладатель. Способ получения витяжки из медицинских пиявок и средство с ее использованием. Патент России на изобретение. № 97106408/14. **1999** ноябрь 20.
239. Никонов, Г.И.; Латрилль Ж. Г., изобретатели; Никонов, Г.И., Латрилль Ж. Г. патентообладатели. Способ получения биологически активной добавки для косметических средств. Патент России на изобретение. № 2001119854/15. **2004** март 20.
240. Никонов, Г. И.; Титова Е. А.; Селезнев, К. Г., изобретатели; Медицинская коллективная научно-внедренческая фирма "Биокон", патентообладатель. Патент России на изобретение. № 94031069/14. **1998** январь 10.

241. Базин А. В.; Горбань В. И.; Пичхидзе С. Я., изобретатели; ООО НВФ "Гируд И.Н.", патентообладатель. Способ получения препарата из медицинской пиявки. Патент России на изобретение. № 2009138779/15. **2012** январь 10.
242. Баскова, И. П.; Базин, А. В.; Копыльцов, В. В., изобретатель; Общество с ограниченной ответственностью научно-внедренческая фирма "ГИРУД И.Н.", патентообладатель. Способ получения препарата из медицинской пиявки. Патент России на изобретение. № 2003129552/15. **2006** март 20.
243. Фролов, О. К.; Литвиненко, Р. О.; Копійка В. В.; Федотов Є. Р., винахідники; Запорізький національний університет, патентовласник. Спосіб отримання антигенів із медичної п'явки. Патент України на корисну модель. **2013** червень 10.
244. Ноздрачев, А.Д.; Поляков, Е.Л., Анатомия крысы (лабораторные животные). СПб.: Лань, **2001**. 464.
245. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington D.C.: National Academy press [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.cpp.edu/~research/acuc/doc/guide%20to%20use%20lab%20animals.pdf> (дата обращения 15.04.**2017**)
246. Council Directive 2010/63/EU of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Communities*, **2010**, 276, 33–79.
247. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (м. Страсбург, Франція, 1986). Збірка договорів Ради Європи. К.: Парламентське видавництво, **2000**. URL: [http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/994\\_137](http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/994_137).
248. Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження». URL: <http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/3447-15>.
249. Порядок проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах. Офіційний вісник України. Офіц. вид., **2012**, 24, 82. (Нормативний документ Міністерства освіти, науки, молоді та спорту України. Наказ від 01.03.2012 № 249).

250. Положення про Комітет з питань етики (біоетики). (Нормативний документ Міністерства освіти, науки, молоді та спорту України. Наказ від 19.11.2012 р. № 1287): Нормативно-правова база Міністерства освіти і науки України (офіційний веб-сайт) [Електронний ресурс]. Режим доступу до документу: <http://www.mon.gov.ua/ua/activity/63/64/normativno-pravova-baza/>.
251. Фролов, О. К., Методичні рекомендації до технологічного регламенту біотехнології медичної п'явки. Запоріжжя : Сору Арт, **2012**. 36.
252. Амінов, Р.Ф.; Фролов, О.К.; Федотов, Є.Р.; Литвиненко, Р.О., винахідники; Запорізький національний університет, патентовласник.Спосіб отримання імуномодулятора. Патент Україна на корисну модель. № u 201712112. **2018** травень 25.
253. Амінов, Р.Ф.; Фролов, О.К.; Федотов, Є.Р., винахідники; Запорізький національний університет, патентовласник. Спосіб імуностимуляції тварин. Патент Україна на винахід. № а 201712102. **2020** червень 25.
254. Нечипоренко, О.Л.; Улько, Л.Г.; Фотіна, Г.А., Визначення параметрів гострої токсичності нового дезінфікуючого засобу «Дезсан». *Науковий вісник ветеринарної медицини*, **2018**, 1, 108-116
255. Наказ України «Про затвердження Порядку проведення до клінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів до клінічного вивчення лікарських засобів» від 14.12.2009 №944 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://zakon0.rada.gov.ua/laws/show/z0053-10>.
256. Фролов, О. К.; Федотов, Є. Р.; Копійка, В. В., винахідники; Запорізький державний університет, патентовласник. Спосіб дослідження крові. Патент Україна на корисну модель. № u 2011 11341. **2012** квітень 10.
257. Хиггинс, К., Расшифровка клинических лабораторных анализов. М.: Бином. Лаборатория знаний, **2017**. 592.
258. Кайдашева, І. П., Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині. Полтава : Полімет, **2003**. 320.
259. Назаренко, Г. И.; Кишкун, А. А., Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. М.: Медицина, **2000**. 544.

260. Блиндарь, В.; Зубрихина, Г.; Матвеева, И.; Кушлинский, Н., Гематологические методы исследования. Клиническое значение показателей крови. Руководство для врачей. М.: Медицинское информационное агентство, **2013**. 96.
261. Коржевский, Д.Э.; Гиляров, А.В., Основы гистологической техники. СПб. : СпецЛит., **2010**. 95.
262. Фролов О. К., Федотов Є. Р., Копійка В. В., Фролова Л. О., винахідники; Запорізький державний університет, патентовласник. Спосіб фарбування мазків венозної крові. Патент Україна на корисну модель. № **62690**. **2003** грудень 15.
263. Амінов РФ, Фролов ОК, Федотов ЄР, винахідники; Запорізький національний університет, патентовласник. Спосіб визначення кисень активуючої здатності нейтрофілів периферичної крові. Патент Україна на винахід. № а201609243. **2017** липень 10.
264. Амінов РФ, Фролов ОК, Федотов ЄР, винахідники; Запорізький національний університет, патентовласник. Спосіб визначення фагоцитарної активності нейтрофілів. Патент Україна на винахід. № а201604503. **2018** квітень 10.
265. Амінов Р. Ф, Фролов О. К, винахідники; Запорізький національний університет, патентовласник. Спосіб стимуляції репродуктивної функції самців. Патент Україна на корисну модель. № u201904675. **2019** грудень 26.
266. Oliveira, A. G., Biostatistics Decoded 2nd Edition. Wiley, **2021**. 473.
267. Hoffman, J., Biostatistics for Medical and Biomedical Practitioners. Academic Press, **2019**. 685.
268. Pagano, M.; Gauvreau, K., Principles of Biostatistics. Chapman and Hall/CRC, **2018**. 585.
269. Амінов, Р. Ф.; Фролов, О. К.; Федотов, Є. Р.; Макеева, 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, 43-48.

270. Амінов, Р. Ф.; Фролов, О. К. Фагоцитарна та метаболічна активність нейтрофілів щурів на ранніх етапах постембріонального розвитку за впливу біологічно активних речовин сольового екстракту *Hirudo verbana*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. **2016**, 7, 96-100..
271. Амінов, Р. Ф.; Фролов, О. К.; Федотов, Є. Р. Реакція бластної трансформації лімфоцитів крові нелінійних самиць щурів, їх приплоду на ранніх етапах постембріонального розвитку на фоні впливу сольового екстракту *Hirudo verbana*. *Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки*. **2018**, 1, 46-52.
272. Амінов, Р.Ф.; Фролов, О.К. Проліферативна активність клітин кісткового мозку щурів за впливу біологічно активних речовин медичної п'явки. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. **2017**, 8(4), 501-505.
273. Амінов Р.Ф.; Сирцов В.К.; Федосєєва О.В., Фролов О. К. Морфологічні показники селезінки та тимусу щурів після впливу сольового екстракту *Hirudo verbana*. *Світ медицини та біології*. **2019**, 4(70), 183-187.
274. Амінов Р. Ф, Фролов О. К, винахідники; Запорізький національний університет, патентовласник. Пристрій для фіксації дрібних лабораторних тварин. Патент Україна на корисну модель. № [u201512710](#). **2016** травень 25.
275. Aminov, R.F.; Frolov, A.K. The impact of fetal load of *Hirudo verbana* saline extract antigens morphometrical, hematological and immunological parameters of rats in the early stages of postembryonic development. *Annals of parasitology*.**2018**, 64(1), 13-20.
276. Арташян, О.С.; Храмцова, Ю.С.; Юшков, Б.Г., Участие тучных клеток в процессе репаративной регенерации щитовидной железы. *Вестник уральской медицинской академической науки*, **2013**, 2, 36.
277. Долгушин, И.И.; Бухарин, О.В., Нейтрофилы и гомеостаз. Екатеринбург: УрО РАН, **2001**. 713.
278. Храмцова, Ю.С.; Арташян, О.С.; Юшков, Б.Г., Морфогенетическая функция иммунокомпетентных клеток при репаративной регенерации тканей с разной

- восстановительной способностью. *Таврический медико-биологический вестник*, **2012**, 3(59), 372-375.
279. Нурашева, Э.Е., Метаболическая и поглотительная активность нейтрофилов у молодых и старых крыс в эксперименте, *Вестник КРСУ*, **2015**, 15(4), 102-104.
280. Амінов, Р.Ф. Проліферативна активність лімфоцитів крові нелінійних самиць щурів, їх приплоду на ранніх етапах постембріонального розвитку на фоні гірудовпливу. *Acta Biologica Ukrainica*, **2018**, (1), 40-45. URL: <https://doi.org/10.26661/2410-0943-2018-1-05>
281. Li, X.; Zheng, T.; Liang, X; Li, J.; Huang, J.; Pan, Z.; Zheng, Y. The effect of the immune system on ovarian function and features of ovarian germline stem cells. *SpringerPlus*, **2016**, 5(1), 990-991.
282. Бабаева, А.Г., Еще раз о морфогенетической, или строительной функции лимфоцитов. *Вестник российской академии естественных наук*. **2010**, 4, 70–74.
283. Геворкян, Н. М.; Бабаева, А. Г., Вариабельность роявлений морфогенетической функции лимфоцитов в зависимости от характера и локализации поврежденного органа. *Вестник российской академии естественных наук*, **2012**, 1, 44–47.
284. 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. *Имунопатология, Аллергология, Инфектология*. **2016**, 4, 6-11.
285. Волошин, М.А., та ін., Лімфоцит - фактор морфогенезу органів. Збірник тез доповідей Науково-практичної конференції «Морфологічні дослідження – виклики сучасності», 23–24 квітня 2015 року, м. Суми, **2015**, 5-6.
286. Бабаева, А. Г.; Геворкян, Н. М.; Зотиков, Е. А., Роль лимфоцитов в оперативном изменении программы развития тканей. М.: РАМН. **2009**. 108.



287. Шишкина, В. В.; Воронцова, З. А., Частный случай проявления морфогенетической активности лимфоцитов в эксперименте. *Вестник новых медицинских технологий*, **2013**, 10(2), 318.
288. Фролов, А.К., Популяционные и субпопуляционные сдвиги лейкоцитов крови под влиянием биологически активных веществ медицинской пиявки. *Імунологія та алергологія: наука і практика*, **2011**, 1, 42-43.
289. Фролов, А.К.; Литвиненко, Р.А.; Фролова, Л.А.; Макеева, Л.В.; Федотов Е.Р., Динамика гомеостатической активации Т-лимфоцитов и натуральных киллеров крови человека после экстракорпоральной краткосрочной холодовой инкубации клеток. *Імунопатологія, алергологія, інфектологія*, **2014**, 1, 63-70.
290. Полетаев, А.Б., Физиологическая иммунология: естественные аутоантитела и проблемы наномедицины. М.: Миклош, **2010**. 218.
291. Храмцова, Ю.С.; Тюменцева, Н.В.; Янович, С.В., Репаративная регенерация семенника при различных функциональных состояниях иммунной системы. *Вестник Уральской медицинской академической науки*, **2011**, 2–1(35), 71-72.
292. Лебедев, К. А.; Понякина, И. Д., Иммунология образраспознающих рецепторов (интегральная иммунология). М. : ЛИБРОКОМ, **2009**. 256.
293. Дранник, Г. Н., Клиническая иммунология и алергологія: пособ. для студ., врачей-интернов, иммунологов, алергологов, врачей лечебного профиля всех спец. 5-е изд., доп. К.: Полиграфплюс, **2011**. 561.
294. Фролов, А. К.; Копейка, В. В.; Федотов Е Р., Особенности реакции бластной трансформации лимфоцитов крови доноров стимулированной растительными лектинами и антигенами кольцецов. *Проблеми екології та медицини*, **2012**, 16 (5-6), 37-40.
295. Амінов, Р. Ф.; Фролов, О. К.; Амінова, А. С., Вплив гірудотерапії на репродуктивну функцію лабораторних щурів. *Acta Biologica Ukrainica*, **2020**, (1), 29-36. URL: <https://doi.org/10.26661/2410-0943-2020-1-04>

296. Davoodi, F.; Taheri, S.; Raisi, A., Leech therapy (*Hirudo medicinalis*) attenuates testicular damages induced by testicular ischemia/reperfusion in an animal model. *BMC Veterinary Research*, 2021, 17(256), 1-15.
297. Aminov, R.; Aminova, A.; Maquyeva, L., Morphological parameters of spleen and thymus of the male rats on the basis of the hirudological influence of *Hirudo verbena*. *Annals of parasitology*. **2022**, 68(1), 55-60.
298. Дунаєвська, О.Ф. Морфологічні зміни селезінки під впливом різноманітних чинників. *Вісник Харківського національного університету імені В. Н.Каразіна. Серія Біологія*, **2016**, 106–124.
299. Бобрышева, И.В., Морфофункциональные особенности тимуса крыс различных возрастных периодов после экспериментальной иммуносупрессии. *Вестник ВГМУ*, **2014**, 13(1),48-55.
300. Aminov, R.; Aminova, A., Indirect effect of substances of the hemophagous parasite *Hirudo verbena* on the immune system of the host rats. *Annals of Parasitology*. **2021**, 67(4), 603–610.
301. Амінов, Р. Ф.; Фролов, О. К.; Амінова, А. С.; Гранкіна, А. О.; Свириденко, А. П., Вплив ендоксану на імунну систему щурів. *Acta Biologica Ukrainica*, **2019**, 1, 5-13. URL: <https://doi.org/10.26661/2410-0943-2019-1-01>
302. Шухтин, В. В.; Гоженко, А. И.; Левицкий, А. П.; Шухтина, И. Н., Влияние квертулина на биохимические показатели сыворотки крови крыс с иммунодефицитом. *Дерматологія та венерологія*, **2013**, 3(61), 38-44.
303. Піняжко, О. Р., Експериментальне відтворення імунодефіциту у щурів. *Актуальні проблеми сучасної медицини*. **2008**, 8(4), 123-127.
304. Суфияров, И. Ф.; Шафиков, Р. М.; Юлдашев, М. Т., Экспериментально-морфологическое обоснование применения циклофосфида для профилактики послеоперационных перитонеальных спаек. *Пермский медицинский журнал*. **2008**, 15(3), 128-132.
305. Смирнов, О. Н.; Инчина, В. А.; Зорькина А., В. Экспериментальное Обоснование Миелопротекторного Действия Мексидола. *Российский онкологический журнал*, **2000**, 5, 25–27.

306. Нестерова, И. В.; Колесникова, Н. В.; Чудилова, Г. А.; Ломтатидзе, Л. В.; Ковалева, С. В.; Евглевский, А. А., Нейтрофильные Гранулоциты: Новый Взгляд на «Старих Игроков». *Иммунология*, **2015**, 4, 257-265
307. Хаитов, Р. М.; Пащенко, М. В.; Пинегин, Б. В., Роль паттернраспознающих рецепторов во врождённом и адаптивном иммунитете. *Иммунология*, **2009**, 1, 66-76.
308. Кашенко, С. А.; Ерохина, В. В., Ультрамикроскопические Изменения Паразитовидных Желез Крыс После Коррекции Циклофосфан-индуцированной Иммуносупрессии Имунофаном. *Український морфологічний альманах*, **2014**, 12(1), 61-64.
309. Ukro, G., Evaluation of the haematological and biochemical effects of Averno®, a herbal formulation, against cyclophosphamide-induced immunomodulated male rats. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, **2013**, 4(9), 3556–3562.
310. Lee, H.Y., *Orostachys Japonicus* A. Berger extracts induce immunity-enhancing effects on cyclophosphamide-treated immunosuppressed rats. *Biomed Res. Int.*, **2019**, **1**: 1–9.

Наукове видання  
(українською мовою)

Монографія

Амінов Руслан Флузович

**ПРИРОДНИЙ ІМУНОМОДУЛЯТОР ІЗ ТІЛ МЕДИЧНИХ П'ЯВОК:  
ОТРИМАННЯ ТА ЗАСТОСУВАННЯ**

Редактор  
Коректор

*Амінова А. С.  
Циткіна Л. М.*

Підписано до друку 05.09.2022. Формат 60×90/16.  
Папір офсетний. Друк ризографічний. Гарнітура Times.  
Умовн. друк. арк. 6,3. Тираж 300 прим. Зам. № 44.

Запорізький національний університет  
69600, м. Запоріжжя, МСП-41  
вул. Жуковського, 66.

Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи  
до Державного реєстру видавців, виготівників  
і розповсюджувачів видавничої продукції  
ДК № 5229 від 11.10.2016.