

Запорізький національний університет
Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

АМІНОВ РУСЛАН ФЛУЗОВИЧ

УДК 599.323.41:595.143:57.083.3(043.5)

ДИСЕРТАЦІЯ

**ВПЛИВ ГІРУДОПУНКТУРИ ТА ЕКСТРАКТУ З ТКАНИН МЕДИЧНОЇ
П'ЯВКИ НА ІМУННУ РЕАКТИВНІСТЬ САМИЦЬ ТА ПРИПЛОДУ ЩУРІВ У
ПОСТЕМБРІОНАЛЬНОМУ ОНТОГЕНЕЗИ**

03.00.09 – імунологія

Подается на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Р.Ф. Амінов

Науковий керівник Фролов Олександр Кирилович, доктор медичних наук,
професор

Київ – 2018

АНОТАЦІЯ

Амінов Р.Ф. Вплив гірудопунктури та екстракту з тканин медичної п'явки на імунну реактивність самиць та приплоду щурів у постембріональному онтогенезі. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступення кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.09 – імунологія. – Запорізький національний університет МОН України. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2018.

Дисертація присвячена дослідженню функціонального стану імунної системи статевозрілих нелінійних самиць щурів, які піддавалися гірудологічному впливу та веденню водно-сольового екстракту *Hirudo verbana* в передкоїтальний та після коїтальний періоди, та функціональний стан імунної системи їх приплоду в постембріональному онтогенезі.

У всьому світі сільськогосподарські тварини та люди, в сучасній екологічній обстановці страждають від імунодефіциту. Для підтримки імунного гомеостазу у вагітних тварин та отримання ефективного, продуктивного приплоду застосовують імуномодулятори рослинного, бактеріального та тваринного походження. Зараз економіка України в значній мірі залежить від аграрно-промислового комплексу. Пошук нових імуномодуляторів для сільського господарства - актуальне завдання. Біологічно активні речовини (БАР) медичної п'явки (МП) проявляють імуномодуляторну активність гомеостатичного характеру та можуть розглядатися, як перспективні препарати для застосування в тваринництві. МП є одним із перспективних продуцентів, понад 100 унікальних БАР, що не мають аналогів у світі та необхідні в сучасній ветеринарії та медицині. Численні літературні дані засвідчують модуляторний вплив МП на клітини вродженого та адаптивного імунітету. МП нормалізують цитокіновий профіль за умов його порушення, впливають на проліферативну активність лімфоцитів, гальмують патологічну активацію системи комплементу, підвищують фагоцитарну активність та ін. Імуномодуляторні

сполуки МП чинять лімфостимуляторний вплив на інтерстиціальний гуморальний транспорт і лімфатичний дренаж тканин. Тому дослідження впливу МП, застосованих до спарювання та після, на стан імунної системи тварин, а також на фізичний розвиток та імунну реактивність їх приплоду, дозволить розширити застосування цих імуномодуляторів у тваринництві.

Мета роботи – дослідити функціональний стан імунної системи статевозрілих нелінійних самиць щурів, які піддавалися впливу слини та водно-сольового екстракту з тканин *Hirudo verbana* в передкоїтальний та після коїтальний періоди, та функціональний стан імунної системи їх приплоду в постембріональному онтогенезі. Для досягнення поставленої мети було досліджено імуотропну дію МП в експериментах *in vitro* та *in vivo*. В експерименті на лабораторних щурах виявлено, що слина та водно-сольовий екстракт МП *Hirudo verbana* стимулюють імунну систему самиць та їх приплоду в ранньому постембріональному онтогенезі.

При аналізі дослідних груп тварин встановлено, що слина та водно-сольовий екстракт МП проявляють виражену морфогенетичну дію на самиць та їх приплід у постембріональному онтогенезі. Встановлено, що при введенні водно-сольового екстракту та гірудологічному впливі, активно проявляється стимулюючий ефект на тканини внутрішнього середовища: гемопоетичну та лімфоїдну, структурною основою яких, є ретикулярна тканина, що відноситься до спеціалізованої пухкої сполучної тканини, що в повній мірі пояснює збільшення еритроцитарних (кількість еритроцитів, гемоглобін), лейкоцитарних (кількість лейкоцитів, функціональна активність нейтрофілів) показників крові, що в свою чергу впливають на ріст та розвиток морфометричних параметрів тіла та лімфоїдних органів імунної системи (селезінка та тимус). Причому пролонгована стимуляція морфогенезу в дослідній групі щурів, крім можливого депонування в тканинах залишкових кількостей БАР слини та водно-сольового екстракту МП, більш ймовірно, обумовлено основною функцією імунної системи: контроль та регуляція гістогенезу всіх тканин. Введення водно-сольового екстракту та гірудологічний

вплив у лабораторних щурів самиць та їх приплоду в постембріональному онтогенезі сприяв підвищенню фагоцитарної активності нейтрофілів крові порівняно з контрольними групами тварин. Відомо, що зниження фагоцитарної активності нейтрофілів веде до хронізації запального процесу, та сприяє підтримці алергії і аутоалергії. Вперше, продемонстровано, що слина та водно-сольовий екстракт МП збільшують оксидативний метаболізм нейтрофілів у самиць щурів та у їх приплоду порівняно з контрольною групою тварин. Такі зміни показників функціональної активності нейтрофілів крові щурів пов'язані з активацією вродженого імунітету під впливом МП. Встановлено, що МП стимулюють непродуктивний імуногенез, який виражається появою лімфоцитів із морфологічними ознаками апоптозу та некрозу. Встановлено, що індукція непродуктивного імуногенезу МП виду *Hirudo verbana*, приводить до апоптозу та некрозу лімфоцитів у культурі клітин, в умовах впливу МП слини та водно-сольового екстракту, ймовірно, є провідним механізмом протизапальної дії МП. Збільшення рівня проліферативної активності лімфоцитів під впливом МП вище спонтанного, можна пояснити наявністю загальних патернів у білковій організації всіх видів. Аналіз даних літератури показує, що формування імунної відповіді розпочинається зі взаємодії патернів із патернрозпізнаючими рецепторами (TLRs) клітин вродженого імунітету, які через клітинні контакти і за допомогою цитокінів залучають до імуногенезу лімфоцити. З цих позицій отримує логічне пояснення також факт, збільшення проліферативної активності лімфоцитів після гірудологічного впливу, як результат збільшення в рециркуляції сенсibiliзованих до МП лімфоцитів, які мають спільні патерни з іншими видами. Перевищення проліферативної активності на МП порівняно зі спонтанними культурами навіть у контрольних самиць, можна пояснити їх поліклональністю, а досягнення при впливі МП рівня поліклонального активатору лімфоцитів Кон А у дослідній групі самиць тварин, підтверджує вище сказане припущення. Виявлені значно низькі показники в приплоду порівняно із дорослими самицями, як у контрольній, так і в дослідній групі тварин, свідчить про відомий факт, щодо імунологічної незрілості цих клітин

на даному онтогенезі в щурів. Такі зміни показників проліферативної активності лімфоцитів крові щурів пов'язані з активацією адаптивного імунітету під впливом МП. Вперше продемонстровано, що МП спричиняють збільшення проліферативної активності клітин кісткового мозку. Вперше встановлено, що МП стимулюють лімфоїдні органи імунної системи (тимус та селезінка), що проявляється в збільшенні маси органів, кількості лімфоцитів на одиницю площі, збільшення площі лімфоїдного фолікулу селезінки, переважання білої пульпи селезінки, порівняно із контрольними групами тварин. Розширено існуючі уявлення стосовно імуномодуляторного впливу МП, застосованих у передкоїтальному та після коїтальному періодах, асоційованого з посиленням репродуктивної ефективності в тварин. Отримані результати збігаються з сучасним уявленням про онтогенетичну динаміку імунологічних реакцій: фактори вродженого імунітету ініціюють імунологічні реакції адаптивного імунітету. Вперше встановлений опосередкований вплив МП на потомство дослідних щурів. Вперше продемонстровано, що гірудологічний вплив та введення стандартизованого водно-сольового екстракту з тіл *Hirudo verbana*, застосовані в передкоїтальному та після коїтальному періодах нелінійним статевозрілим самицям щурів, чинять виразну стимуляторну дію на вроджену та адаптивну ланки імунної системи самиць, та їх приплоду в постембріональному онтогенезі в динаміці на 1, 15, 30, 45, 60-ту добу: збільшують кількість циркулюючих лейкоцитів, посилюють поглинальну активність та оксидативний метаболізм нейтрофілів, посилюють проліферативну активність лімфоцитів та кісткового мозку, стимулюють лімфоїдні органи імунної системи. Отримані експериментальні результати вказують на те, що МП *Hirudo verbana* в цілому стимулюють імунну систему самиць та їх приплоду в постембріональному онтогенезі, які можуть бути використані в ветеринарії, при розведенні свійських тварин.

Ключові слова: біологічно активні речовини, медична п'явка, імуномодулятори природного походження, вроджений імунітет, адаптивний імунітет.

SUMMARY

Aminov R.F. Effect of hirudopuncture and extract tissue of medical leech on immune reactivity of females and offspring of rats in post-embryonic ontogenesis. - Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.

Dissertation for a scientific degree of the candidate of biological sciences, specialty 03.00.09 - Immunology. – Zaporizhzhia National University of Ministry of Education and Science of Ukraine. - Kyiv National Taras Shevchenko University, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2018.

The dissertation is devoted to the study of the functional state of the immune system of sexually mature nonlinear female rats exposed to the hirudological influence and management of the *Hirudo verbana* water-salt extract in the period before mating and the period after mating, and the functional state of the immune system of their offspring in the post-embryonic ontogenesis.

Throughout the world, farm animals and people, in a modern environmental situation, suffer from an immunodeficiency. Immunomodulators of plant, bacterial and animal origin are used to support immune homeostasis in pregnant animals and to obtain an effective, productive offspring. At present, the Ukrainian economy is heavily dependent on the agro-industrial complex. The search for new immunomodulators for agriculture is a relevant task. Biologically active (BAS) medical leeches (ML) exhibit immunomodulatory activity of a homeostatic nature and can be considered as promising preparations for use in livestock breeding. ML is one of the promising producers of more than 100 unique BASs that aren't have analogues in the world and are needed in modern veterinary and medical sciences. Numerous literature data demonstrate the modulatory effect of ML on innate and adaptive immune cells. ML normalizes the cytokine profile in conditions of its violation, influenced by the proliferative activity of lymphocytes, inhibits pathological activation of the complement system, increases phagocytic activity, etc. Immunomodulatory compounds of ML have a lymphostimulatory effect on interstitial humoral transport and lymphatic drainage of tissues. Therefore, the study of the effect of ML, applied

before and after pairing, on the state of the immune system of animals, as well as on the physical development and immune reactivity of their litter will allow to extend the use of these immunomodulators in livestock.

The goal of the work was to investigate the functional state of the immune system of sexually mature nonlinear female rats exposed to saliva and water-salt extract of *Hirudo verbana* in the period before mating and the period after mating, and the functional state of the immune system of their offspring in post-embryonic ontogenesis. To achieve the goal, the immunotropic action of ML was investigated *in vitro* and *in vivo* experiments. In an experiment in laboratory rats it was discovered of saliva and hydro-salt extract of *Hirudo verbana* ML stimulate the immune system of females and their offspring in early post-embryonic ontogenesis.

In the analysis of experimental animal groups was established of saliva and water-salt extract of ML have a pronounced morphogenetic effect on females and their growth in post-embryonic ontogenesis. It was established that the introduction of water-salt extract and the hirudological effect stimulate the internal tissues of the internal environment: hematopoietic and lymphoid, the structural basis of which is a reticular tissue that belongs to a specialized puffy connective tissue, which fully explains the increase of erythrocytes (the number of erythrocytes , hemoglobin), leukocytes (the number of leukocytes, functional activity of neutrophils) of blood parameters, which in turn affect the growth and development of morphometric body parameters and lymphoid organs of the immune system (spleen and thymus). Moreover, prolonged stimulation of morphogenesis in the experimental group of rats, in addition to the possible depositing in the tissues of residual amounts of saliva and water-salt extracts of ML, is more likely due to the main function of the immune system: control and regulation of the histogenesis of all tissues. Putting water-salt extract and hirudological influence in laboratory rats of females and their offspring in post-embryonic ontogenesis contributed to increased phagocytic activity of blood neutrophils compared to control groups of animals. It is known that the decrease phagocytic activity of neutrophils leads to chronic inflammatory process and promotes the maintenance of allergy and auto-allergy. For the first time, it has been

demonstrated ML saliva and water-salt extract increase the oxidative metabolism of neutrophils in female rats and their offspring compared with the control group of animals. Such changes in the parameters of functional activity of blood neutrophils in rats are associated with the activation of congenital immunity under the influence of ML. It was established that ML stimulates non-productive immunogenesis, which is manifested by the appearance of lymphocytes with morphological features of apoptosis and necrosis. It was found that induction of unproductive immunogenesis of ML of the species *Hirudo verbana* leads to apoptosis and necrosis of lymphocytes in cell culture, under conditions of influence of ML of saliva and water-salt extract, it is probably the leading mechanism of anti-inflammatory action of ML. An increase in the level of proliferative activity of lymphocytes under the influence of ML is higher than spontaneous, can be explained by the presence of common patterns in the protein structure of all species. The analysis of literature shows that the formation of the immune response begins with the interaction of patterns with pattern recognition receptors (TLRs) of innate immune cells, which through the cellular contacts and with the help of cytokines involve lymphocytes immunogenesis. From these positions, the fact of an increase in the proliferative activity of lymphocytes after the hirudological influence, as a result of an increase in the recirculation of sensitized of ML lymphocytes, which have common patterns with other species - gets a logical explanation. Excess of proliferative activity on ML compared to spontaneous cultures, even in control females, can be explained by their polyclonality, and the achievement with the influence of ML of the level of the polyclonal activator of lymphocytes Con A in the experimental group of female animals confirms the above assumption. Significantly low rates in the offspring compared to adult females, both in the control and in the experimental group of animals, indicate a well-known fact about the immunological immaturity of these cells in this ontogenesis in rats. Such changes in the indicators proliferative activity of blood lymphocytes in rats are associated with the activation of adaptive immunity under the influence of ML. For the first time, it has been demonstrated that ML causes an increase in the proliferative activity of bone marrow cells. It was first discovered that ML stimulates the

lymphoid organs of the immune system (thymus and spleen), which is manifested in the increased body weight, the number of lymphocytes per unit area, the increase in the area of the lymphoid follicle of the spleen, the prevalence of the white spleen of the spleen in comparison with the control groups of animals. Existing views on the immunomodulatory effect of ML, applied extract in the period before mating and the period after mating, associated with increased reproductive efficacy in animals have been expanded. The obtained results coincide with the current conceptions of the ontogenetic dynamics of immunological reactions: the factors of congenital immunity trigger immunological responses of adaptive immunity. The first, the indirect effect of ML on the progeny of experimental rats has been established. It has been shown for the first time that the hirudological effect and the introduction of a standardized water-salt extract from *Hirudo verbanas* bodies used in the period before mating and the period after mating of non-linear, mature female rats, have a distinct stimulatory effect on the innate and adaptive links of the immune system of females and their offspring in post-embryonic ontogenesis in dynamics at 1, 15, 30, 45, 60th day: with the increase number of circulating leukocytes, the increase of absorbent activity and oxidative metabolism of neutrophils, amplify proliferative activity of lymphocytes and bone marrow, stimulate the lymphoid organs of the immune system. The experimental results obtained indicate that ML *Hirudo verbana* and in general stimulate the immune system of females and their offspring in post-embryonic ontogenesis, which can be used in veterinary medicine, when breeding domestic animals.

Key words: biologically active substances, medical leeches, immune modulators of natural origin, congenital immunity, adaptive immunity.

Список публікацій здобувача за темою дисертації

1. Амінов РФ, Фролов ОК, Федотов ЄР. Морфометричні параметри тіла та імунологічних органів щурів на ранніх етапах постембріонального розвитку на фоні гірудовпливу *Hirudo verbana* в передембріональний і ембріональний періоди розвитку. Вісник Запорізького національного університету: збірник наукових праць. Біологічні науки. 2017; 1: 71-77.

2. Амінов РФ, Фролов ОК. 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.

3. Амінов РФ, Фролов ОК, Федотов ЄР, Макєєва ЛВ. 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.

4. Амінов РФ, Фролов ОК. Проліферативна активність клітин кісткового мозку щурів за впливу біологічно активних речовин медичної п'явки. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2017; 8 (4): 501-505.

5. Aminov RF, Frolov AK. Influence of ectoparasite - *Hirudo verbana* on morphogenetic reactions of the host organism – *rattus*. *Current trends in immunology*. 2017; 18: 107-117.

6. Aminov RF, Frolov AK. The impact of fetal load of *Hirudo verbana* saline extract antigens morphometrical, hematological and immunological parameters of rats in the early stages of post-embryonic development. *Annals of parasitology*. 2018; 64(1): 13-20.

7. Аминов РФ, Фролов АК, Федотов ЕР. Влияние внутриутробной нагрузки биологически активными веществами солевого экстракта *Hirudo verbana* на морфометрические и гематологические показатели крыс на ранних

етапах постэмбрионального розвитку. Иммунопатология, Аллергология, Инфектология. 2016; 4: 6-11.

8. Фролов ОК, Амінов РФ, Даниленко Ю. Гематологічно-морфометричні зміни показників у щурів на фоні вливу сольового екстракту *Hirudo verbena*. Актуальні питання біології, екології та хімії». 2018; 15(1): 118-126.

Патенти:

1. Амінов РФ, Фролов ОК, Федотов ЄР, винахідники; Запорізький національний університет, патентовласник. Пристрій для фіксації дрібних лабораторних тварин. Патент Україна на корисну модель. № u 201512710. 2016 травень 25.

2. Амінов РФ, Фролов ОК, Федотов ЄР, винахідники; Запорізький національний університет, патентовласник. Спосіб визначення фагоцитарної активності нейтрофілів. Патент Україна на винахід. № а 201604503. 2018 квітень 10.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	15
ВСТУП	16
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	23
1.1 Застосування медичних п'явок у медицині та ветеринарії.....	23
1.1.1 Використання медичних п'явок у медицині.....	23
1.1.2 Використання медичних п'явок у ветеринарії.....	28
1.2 Біологічно активні речовини медичної п'явки.....	30
1.2.1 Літичні сполуки.....	31
1.2.2 Антигемостатики	32
1.2.3 Блокатори захисних реакцій організму.....	33
1.2.4 Допоміжні речовини.....	35
1.3 Основні вікові особливості імунної реактивності щура.....	38
1.3.1 Загальна характеристика крові щура.....	38
1.3.2 Особливості зміни імунологічних показників крові імунної системи щура з віком.....	39
1.4 Вікові особливості будови лімфоїдних органів імунної системи: селезінки та тимусу щура.....	41
1.4.1 Особливості морфологічної будови тимусу здорових щурів із віком.....	41
1.4.2 Вікові особливості зміни морфологічної будови селезінки щурів.....	44
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	48
2.1 Дослідні тварини.....	48
2.2 Схеми експериментальних досліджень.....	49
2.2.1 Схема дослідження імунотропних ефектів слини медичної п'явки <i>Hirudo verbana</i> в експерименті на лабораторних щурах при гірудовпливу.....	49
2.2.2 Схема дослідження імунотропних ефектів водно-сольового екстракту медичної п'явки <i>Hirudo verbana</i> в експерименті на лабораторних щурах.....	50
2.3 Визначення морфометричних показників тіла та лімфоїдних органів.....	51
2.4 Підготовка зразків біологічного матеріалу.....	51

2.5 Імунологічні методи дослідження.....	52
2.5.1 Оцінка лейкоцитарного складу крові.....	52
2.5.2 Оцінка проліферативної активності лімфоцитів	53
2.5.3 Визначення фагоцитарної активності нейтрофілів	54
2.5.4 Дослідження оксидативного метаболізму нейтрофілів	55
2.6 Оцінка показників гемограми.....	56
2.7 Оцінка проліферативної активності кісткового мозку тварини.....	56
2.8 Гістологічні дослідження	57
2.9 Статистична обробка отриманих результатів	58
РОЗДІЛ 3 ВПЛИВ СЛИНИ МЕДИЧНОЇ П'ЯВКИ, ЗАСТОСОВАНОЇ САМИЦЯМ ЩУРІВ У ПЕРЕД- ТА ПІСЛЯ КОЇТАЛЬНОМУ ПЕРІОДАХ, НА ЇХ ІМУННУ РЕАКТИВНІСТЬ ТА ІМУННИЙ СТАТУС ПРИПЛОДУ В ДИНАМІЦІ ПОСТЕМБРІОНАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗУ	59
3.1 Гематологічні показники, морфометричні характеристики тіла та лімфоїдних органів приплоду в постембріональному онтогенезі за гірудовпливу статевозрілих самиць щурів у передкоїтальному та після коїтальному періодах.....	60
3.2 Поглинальна активність та оксидативний метаболізм нейтрофілів крові самиць та їх приплоду в постембріональному онтогенезі.....	69
3.3 Проліферативна активність лімфоцитів крові самиць та їх приплоду в постембріональному онтогенезі	71
3.4 Мітотичний індекс кісткового мозку самиць щурів та їх приплоду в постембріональному онтогенезі	74
3.5 Цитоморфологічні показники селезінки та тимусу статевозрілих самиць щурів та їх приплоду в постембріональному онтогенезі. Кореляція між показниками маси тіла та лімфоїдних органів статевозрілих самиць щурів та їх приплоду в постембріональному онтогенезі	75
РОЗДІЛ 4 ВПЛИВ ВОДНО-СОЛЬОВОГО ЕКСТРАКТУ <i>HIRUDO VERBANA</i> , ЗАСТОСОВАНОГО САМИЦЯМ ЩУРІВ У ПЕРЕД- ТА ПІСЛЯ КОЇТАЛЬНОМУ ПЕРІОДАХ, НА ЇХ ІМУННУ РЕАКТИВНІСТЬ ТА	

ІМУННИЙ СТАТУС ПРИПЛОДУ В ДИНАМІЦІ ПОСТЕМБРІОНАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗУ	83
4.1 Гематологічні показники, морфометричні характеристики тіла та лімфоїдних органів приплоду в постембріональному онтогенезі за впливу водно-сольовоно екстракту <i>Hirudo verbana</i> статевозрілим самицям щурів у передкоїтальному та після коїтальному періодах.....	83
4.2 Поглинальна активність та оксидативний метаболізм нейтрофілів крові самиць та їх приплоду в постембріональному онтогенезі	92
4.3 Проліферативна активність лімфоцитів крові самиць та їх приплоду в постембріональному онтогенезі	94
4.4 Мітотичний індекс кісткового мозку самиць щурів та їх приплоду в постембріональному онтогенезі.....	96
4.5 Цитоморфологічні показники селезінки та тимусу статевозрілих самиць щурів та їх приплоду в постембріональному онтогенезі. Кореляція між показниками маси тіла та лімфоїдних органів статевозрілих самиць щурів та їх приплоду в постембріональному онтогенезі	97
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	105
ВИСНОВКИ.....	112
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	114
ДОДАТОК 1.....	144

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ І
ТЕРМІНІВ

ГТ	гірудотерапія
МП	медична п'явка
БАР	біологічно активні речовини
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
ФСПБ	філогенетично стабільні послідовності біополімерів
ОМН	оксидативний метаболізм нейтрофілів
ФНП	фактор некрозу пухлин
ЛФ	лімфоїдний фолікул
ПАЛВ	періартеріальні лімфоїдні муфти
CD	cluster of differentiation – кластер диференціації

ВСТУП

Актуальність теми. Використання медичних п'явок (МП) при гірудотерапії (ГТ) обумовлено широким спектром терапевтичної дії їх біологічно активних речовин (БАР): регуляцією гемостазу та судинного тону, протизапальним, регенераційним, нейротропним, бактеріостатичним, імуномодуляторним ефектами [1-7].

МП є одним із перспективних продуцентів, понад 100 унікальних БАР, що не мають аналогів у світі та необхідні в сучасній ветеринарії та медицині — гірудин, егліни, бделіни, ферменти: гіалуронідаза, дестабілаза, колагеназа, апіраза, еластаза [1, 4; 8-11]. Численні літературні дані засвідчують модуляторний вплив МП на клітини вродженого та адаптивного імунітету. Імуномодуляторна дія МП має гомеостатичний характер [1]. Відомо, що МП при ГТ забезпечують відновлення попередньо знижених фагоцитарних показників моноцитів/макрофагів до нижньої межі норми [12]. Протизапальна дія ГТ супроводжується зниженням абсолютної кількості циркулюючих нейтрофілів. Однак, при цьому відновлюється фагоцитарна та секреторна функції поліморфноядерних лейкоцитів, підвищується вміст лізосомально-катіонних білків, що свідчить про нормалізацію стану їх кисневонезалежної системи та активацію механізмів місцевого неспецифічного імунного захисту [8, 14]. У низці досліджень показано, що секрет слинних залоз МП гальмує патологічну активацію системи комплементу [1, 8, 14-18].

МП позитивно впливають на проліферативну (спонтанну та стимульовану) активність лімфоцитів [19]. В умовах активації імунної системи на тлі розвитку запальних захворювань МП знижують кількість CD3+, CD4+, CD8+ Т-лімфоцитів одночасно з підвищенням кількості циркулюючих CD20+ клітин [8, 18]. МП нормалізують цитокиновий профіль за умов його порушення: знижуються попередньо підвищені рівні прозапальних ІЛ-1 β , ІЛ-2 та ФНП- α та нормалізується рівень протизапального ІЛ-4, відповідно з цим нормалізується і співвідношення між прозапальними й протизапальними цитокінами [8,19-22].

Клінічні спостереження засвідчують здатність МП впливати на системний та місцевий імунітет у хворих із хронічними захворюваннями слизової оболонки рота [20].

Імуномодуляторні сполуки МП чинять лімфостимуляторний вплив на інтерстиціальний гуморальний транспорт та лімфатичний дренаж тканин при реабілітації хворих із ішемічною хворобою серця середнього та похилого віку [8,14]. МП при ГТ позитивно впливають на стан ендотеліальної функції, антиоксидантний захист, процеси ліпопероксидації та рівні деяких цитокінів і клінічний перебіг захворювання в пацієнтів із ревматоїдним артритом [8, 22]. У сукупності всі ці літературні дані свідчать про те, що більшість терапевтичних ефектів ГТ опосередковані її імуномодуляторним впливом.

Людина та водопійні тварини (в основному копитні) мутуалістично адаптовані до МП, в процесі тривалої коєволюції при гірудологічних контактах, тому ГТ забезпечує широкий спектр терапевтичних ефектів, практично в відсутності побічних негативних наслідків. Кількість протипоказань до ГТ мінімальна – це патологія гемостазу, онкологічна патологія, а також, за даними деяких авторів - вагітність [23, 24]. Численні дослідницькі групи гірудотерапевтів [16, 25, 26] вважають останнє протипоказання незначущим, і допускають превентивні приставки МП при загрозі розвитку тромбофлебіту, гестозів, вважаючи, що ГТ спричиняє поліпшення кровопостачання тканин матері та плоду, а тератогенна дія МП не зафіксована. Зареєстровано позитивний вплив МП на формотворчі регенераційні процеси при гірудотерапії [7, 18, 27, 28]. Доведено, що МП стимулюють ріст нервових волокон спінального ганглію ембріона курки [7].

На додачу до функції захисту від інфекційних чинників, імунна система виконує регуляторну функцію, в тому числі й у формотворчих процесах репродукції, таких як децидуалізація, плацентація, морфогенез плоду тощо [29°-32]. Імуномодулятори широко використовуються в тваринництві, для стабілізації імунного гомеостазу вагітних тварин, який є запорукою фізіологічної гестації та здоров'я приплоду [33, 34]. Гірудовплив (ГВ) із

успіхом застосовується в тваринництві, для корекції імунної реактивності в постпологовому періоді та стимуляції лактації [35 - 41]. Дослідження впливу БАР МП, застосованих до спарювання та після, на стан імунної системи тварин, а також на фізичний розвиток та імунну реактивність їх приплоду, дозволить розширити застосування цих імуномодуляторів у тваринництві.

Сільськогосподарські тварини, як і люди, у сучасній екологічній обстановці страждають від імунодефіциту. Для підтримки імунного гомеостазу в вагітних тварин, необхідного для успішної гестації та отримання ефективного, продуктивного приплоду, застосовують імуномодулятори рослинного, бактеріального та тваринного походження (наприклад гормони тимусу, фетальну сировотку та ін.). Економіка України в значній мірі залежить від аграрно-промислового комплексу. Отже, пошук нових імуномодуляторів для сільського господарства - актуальне завдання. МП мають імуномодуляторну активність гомеостатичного характеру та можуть розглядатися, як перспективні препарати для застосування в тваринництві.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана на кафедрі фізіології, імунології і біохімії з курсом цивільного захисту та медицини Запорізького національного університету в рамках науково-дослідної теми «Біотехнологія перспективних кільцеців з вивченням імунотропної дії їх біологічно активних речовин» (№°державної реєстрації 0117U000704.)

Мета і задачі дослідження. Дослідити функціональний стан імунної системи статевозрілих нелінійних самиць щурів, які піддавалися впливу слини та водно-сольового екстракту з тканин *Hirudo verbana* в передкоїтальний та після коїтальний періоди, та функціональний стан імунної системи їх приплоду в постембріональному онтогенезі.

Для досягнення мети були поставлені наступні задачі:

1. Дослідити вплив слини та водно-сольового екстракту з тканин *Hirudo verbana*, застосованих у перед- та після коїтальному періодах, на фізичні

параметри тіла, морфометричні та цитоморфологічні показники лімфоїдних органів самиць та їх приплоду в постембріональному онтогенезі.

2. Вивчити вплив слини та водно-сольового екстракту з тканин *Hirudo verbana*, застосованих у перед- та після коїтальному періодах, на мітотичний індекс кісткового мозку самиць та їх приплоду в постембріональному онтогенезі.

3. Провести дослідження впливу слини та водно-сольового екстракту з тканин *Hirudo verbana*, застосованих у перед- та після коїтальному періодах, на гематологічні показники самиць та їх приплоду в постембріональному онтогенезі.

4. Проаналізувати вплив слини та водно-сольового екстракту з тканин *Hirudo verbana*, застосованих у перед- та після коїтальному періодах, на поглинальну (фагоцитоз) активність та оксидативний метаболізм нейтрофілів крові самиць та їх приплоду в постембріональному онтогенезі.

5. Провести дослідження впливу слини та водно-сольового екстракту з тканин *Hirudo verbana*, застосованих у перед- та після коїтальному періодах, на проліферативну активність лімфоцитів самиць та їх приплоду в постембріональному онтогенезі.

Об'єкт дослідження – імуномодуляторні ефекти слини та водно-сольового екстракту *Hirudo verbana*

Предмет дослідження – популяційний склад лейкоцитів периферичної крові, поглинальна (фагоцитарна) активність та оксидативний метаболізм нейтрофілів; проліферативна активність лімфоцитів; мітотичний індекс кісткового мозку; морфометричні та морфологічні характеристики первинного та вторинного лімфоїдних органів самиць та їх приплоду в постембріональному онтогенезі, за впливу слини та водно-сольового екстракту *Hirudo verbana*.

Методи дослідження: у роботі були використанні імунологічні, морфометричні, гістологічні, статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів. Розширено існуючі уявлення стосовно імуномодуляторного впливу слини та водно-сольового екстракту з

тканин МП, застосованих у передкоїтальному та після коїтальному періодах, асоційованого з посиленням репродуктивної ефективності у тварин.

Уперше встановлено, що стандартизований водно-сольовий екстракт та слина *Hirudo verbana*, застосовані в передкоїтальному та після коїтальному періодах нелінійним статевозрілим самицям щурів, чинять виразну стимуляторну дію на їх імунну систему та імунну реактивність їх приплоду в постембріональному онтогенезі: збільшується кількість циркулюючих лейкоцитів, посилюється поглинальна активність та оксидативний метаболізм нейтрофілів, підвищується проліферативна активність лімфоцитів та кісткового мозку.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані експериментальні результати вказують на те, що слина та стандартизований водно-сольовий екстракт з тканин МП *Hirudo verbana* викликають стимуляцію імунної системи самиць та їх приплоду, асоційовану зі збільшенням ваги останнього, що може бути використано у ветеринарії, при розведенні свійських тварин. Розроблено пристрій для фіксації дрібних лабораторних тварин (патент України на корисну модель № 107289 від 25.05.2016) та спосіб визначення фагоцитарної активності нейтрофілів (патент України на винахід № 116579 від 10.04.2018), які можуть бути використані в фундаментальних та прикладних імунологічних дослідженнях.

Матеріали дисертації використовуються в навчальному процесі на кафедрах: фізіології, імунології та біохімії з курсом цивільного захисту та медицини Запорізького національного університету МОН України; гістології, цитології та ембріології Запорізького державного медичного університету МОЗ України; органічної та біологічної хімії Мелітопольського державного педагогічного університету імені Б. Хмельницького, що підтверджено актами впровадження.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем особисто проаналізовано наукову літературу за темою роботи, самостійно виконано експериментальні дослідження та підготовку матеріалів до публікації. За участі співавторів

публікацій проведено інтерпретацію отриманих результатів. Планування експериментальних робіт, аналіз та обговорення отриманих результатів проведено спільно з науковим керівником д.м.н. Фроловим О.К.

Для розширення знань в функціональних особливостях кровотворних та імунних органів здобувач проходив стажування з наукового напрямку: Функціональні особливості кровотворних і імунних органів у віковому аспекті, на кафедрі гістології, цитології і ембріології ЗДМУ (2017 р.).

Автор виносить подяку доктору медичних наук, професору В.К. Сирцову та кандидату медичних наук, доценту О.В. Федосєєвій, кафедри гістології, цитології та ембріології «Запорізького державного медичного університету» МОЗ України, за керівництво стажуванням та безпосередню допомогу.

Автор висловлює особливу подяку своєму науковому керівнику доктору медичних наук, професору О. К. Фролову, за неоціненну всебічну допомогу, підтримку, поради і консультації під час виконання та написання дисертаційної роботи.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертації були представлені на вітчизняних та міжнародних конференціях: IV Регіональній науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих учених «Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих, медичних та фармацевтичних наук» з всеукраїнською участю (Запоріжжя, 2015); V Регіональній науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих, медичних та фармацевтичних наук» (Запоріжжя, 2016); IX Університетській науково-практичній конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Молода наука-2016» (Запоріжжя, 2016); XV Всеукраїнській науковій конференції з очно-заочною участю «Актуальні питання біології та медицини» (Старобільськ, 2017); Всеукраїнській конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації - 2017», присвячена Дню науки (Запоріжжя, 2017); Всеукраїнській науковій конференції з дистанційною участю «Актуальні питання біології та медицини» (Суми, 2017); IV

Міжнародній науково-практичній конференції студентів і молодих вчених «Наука и медицина: современный взгляд молодежи» (Казахстан, 2017); V Міжнародній науково-практичній конференції Присвяченої 30-річчю біологічного факультету Запорізького національного університету (Запоріжжя, 2017); LXX Міжнародній науково-практичній конференції студентів і молодих вчених «Актуальные проблемы современной медицины и фармации-2017» (Білорусь, 2017); IV Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпропетровськ, 2017); Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Нові досягнення в імунології та алергології» (Київ, 2017); Другому симпозиумі міжнародній асоціації гірудотерапевтів і гірудологів (Болгарія, 2017); Науково-практичній конференції «Прикладні аспекти морфології», присвяченій пам'яті професорів-морфологів Терентьєва Г.В., Роменського О.Ю., Когана Б.Й., Шапаренка П.П., Жученка С.П. (Вінниця, 2017); III Міжнародній науковій конференції «Мікробіологія і імунологія – перспективи розвитку в ХХІ столітті» (Київ, 2018).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 24 наукові праці, у тому числі 4 статті у фахових виданнях, що входять до переліку МОН України, 3 статті у зарубіжних фахових виданнях, 1 стаття у нефарховому виданні, 14 публікацій у збірниках наукових праць, збірниках матеріалів і тезах науково-практичних конференцій, конгресів, з'їздів, форумів, отримано 1 патент на корисну модель та 1 патент на винахід.

Структура і обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, двох розділів результатів дослідження та їх обговорення, аналізу та узагальнення цих розділів, висновків, списку використаних літературних джерел та додатку. Робота викладена на 149 сторінках (з них 113 сторінок основної частини), ілюстрована 10 таблицями та 14 рисунками. Перелік використаних літературних джерел складається зі 313 найменування, з них кирилицею – 210, латиницею – 103.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Застосування медичних п'явок у медицині та ветеринарії

У світі відомо понад 600 видів п'явок, але лише три види МП частіше використовують із профілактично-лікувальною метою: аптечну (*H. verbana* Carena, 1820), медичну/українську (*H. medicinalis* Linnaeus, 1758) [1, 8, 24, 42], рідше — східну п'явку (*H. orientalis* S. Utevsky et Trontelj, 2005) [1, 24]. До 2004 р. переважала думка серед науковців про те, що всі підвиди МП в Європі є представниками одного і того ж виду *Hirudo medicinalis* [1, 16], але останні дослідження підтверджують, що всі підвиди МП – це один вид [8, 43], а саме: *H. medicinalis*, *H. verbana* та *H. orientalis* [8, 44-47]. Зі змінами в класифікації виявляється, що більшість п'явок, які використовуються з профілактично-лікувальною метою є не медичними (*H. medicinalis*), а аптечними (*H. verbana*) [8, 46, 47]. Однак, законодавчо захищеним є вид *H. medicinalis*, тому, відповідна таксономічна корекція в міжнародних природоохоронних конвенціях та законодавстві є суттєвою [8, 44].

1.1.1 Використання медичних п'явок у медицині

У складі слини МП містяться більше 100 БАР, які володіють багатьма терапевтичними ефектами при ГВ. Так, ГТ та фармакологічні препарати на основі секрету слинних залоз (ССЗ) МП ефективно використовують із метою профілактики та лікуванні багатьох захворювань [8, 48-51], а саме: в дерматології — для лікування хронічних дерматозів [52-54], лейоміоми шкіри [55], псоріазу [56,57]; в кардіології — при лікуванні серцевої недостатності [58], гіпертонічної хвороби [59], інфекційного міокардиту [60], стенокардії [61]; в офтальмології — для лікування глаукоми [62-66], геморагічно-фібриноїдного

синдрому [67]; в оториноларингології — при гострій сенсоневральній приглухуватості [68,69], гострих та хронічних захворюваннях середнього та внутрішнього вуха [70-72]; в травматології — при радикулопатіях [73], артритих [74-76], остеохондрозах [77, 78], артрозах [79]; у невропатології — при цереброваскулярних захворюваннях [80-85]; у гінекології — при ендометріозі, міомі матки, хронічних запаленнях придатків [86-88]; у терапії — при нефритах [89], діабетичній стопі [90]; в ендокринології — при діабеті [91]; в хірургії — при лікуванні тромбофлебітів [92-94], варикозу та інших судинних розладів [95-100]; в стоматології — при хронічних та дистрофічних захворюваннях слинних залоз [101], при стоматитах, пульпітах та ін. [15, 101-111]. Також ефективно застосування ГТ в психотерапії [112-114], для усунення проявів алергії [115]. В практиці зарубіжних країн МП використовують при трансплантаціях із метою усунення венозного застою (конгестії) [8, 116-127], до того ж із превентивною антибіотикотерапією, в реконструктивній хірургії [128-134]. Нещодавно, ГТ почали застосовувати в терапії раку [8, 128, 133, 134], проводяться дослідження щодо терапевтичної ролі МП при різних хворобах [135-138], таких як інфекційні захворювання [139-142], чоловіче та жіноче безпліддя [143, 144], чоловічий пріапізм [145], діабет, захворювання передміхурової залози, бронхіальна астма, еритематозний вовчак та багато інших. ГТ також використовують із метою профілактики онкологічних захворювань [8, 45, 146]. Але існують деякі протипоказання до ГТ, серед яких: тривалі кровотечі, захворювання, що характеризуються схильністю до кровоточивості (геморагічні діатези), кахексія, виражена анемія, алергія на МП [1, 8, 16, 23, 24]. Сучасне лікування МП відрізняється від стародавньої терапії. В даний час, з терапевтичною метою використовують лише п'явок, вирощених на біофабриках, які пройшли суворий карантин, до того ж одноразово, з наступною утилізацією [8, 146].

Встановлена чітко виражена протизапальна, бактеріотропна, імунотропна дії ГТ [8, 16, 23, 24], але в сучасній вітчизняній та зарубіжній літературі існують поодинокі та суперечливі роботи, що стосуються імунотропного

впливу ГТ [8, 70, 147]. Встановлено, що ССЗ МП стимулює ФАН та антикомплементарну активність секрету [1, 16, 147]. Є дані про активуючий вплив ГТ на лімфоцити периферичної крові, що свідчить про те, що більшість терапевтичних ефектів ГТ опосередковані через її імуномодулюючий вплив [8, 18]. Ряд досліджень свідчить про нормалізацію цитокінового профілю після ГТ [8, 17, 21, 22].

Дослідження В. М. Фролова та ін. (2008) присвячені вивченню впливу БАР при ГТ на функціональну активність макрофагів при захворюваннях, що супроводжуються вторинними імунодефіцитними станами, показали, що після сеансів ГТ активуються попередньо знижені фагоцитарні показники моноцитів/макрофагів до нижньої межі норми та підвищуються функціональна активність системи фагоцитуючих макрофагів [8, 12]. Дослідження вітчизняних вчених (І. І. Зельоний та ін., 2010) доводять, що після ГТ нормалізується цитокіновий профіль. Так, включення сеансів ГТ до комплексу лікувальних заходів у хворих із рецидивуючої бешихою на тлі варикозної хвороби вен гомілки в більшості випадків відновлюється вміст цитокінів у крові: знижуються попередньо підвищені рівні прозапальних ІЛ-1 β , ІЛ-2 та ФНП- α та нормалізація рівня протизапального ІЛ-4, відповідно з цим нормалізується і співвідношення між прозапальними й протизапальними цитокінами [8, 17].

Виявлена ефективність після застосування ГТ у педіатрії при лікуванні ускладнень важких форм перитоніту (М. В. Глагович, 2006) [21], які супроводжуються лейкоцитозом, високим лейкоцитарним індексом інтоксикації та еозинофілією, гіперпродукцією ФНП- α . При застосуванні сеансів ГТ знижується концентрація ФНП- α , швидше нормалізується загальний стан хворого, температура тіла, показники крові, зменшується тривалість лікування [8, 21].

Доведена ефективність використання ГТ в оториноларингології (О.О.Щетініна, 2001). Після сеансів ГТ у хворих із хронічними запальними процесами в вусі супроводжується покращення слуху за рахунок загальної дії ССЗ МП на організм людини, зниження можливості рецидивів. ГТ здійснювала

ефективну знеболюючу, протизапальну, протинабрякову та антибактеріальну дію, а також загальну дію на організм людини при гострому зовнішньому дифузному отиті, нейросенсорній приглухуватості, вушних шумах, травмах вушної раковини [8, 70].

Ефективно ГТ показала себе при рецидивуючих фурункулах носа (А.°О.°Станченко, 2004), які супроводжуються системною ендотоксемією з розвитком гнійно-септичних, тромбогеморагічних ускладнень. Відомо, що ендотоксин грамнегативної флори кишечника є інтегральним чинником, на якому перетинаються імунна і 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 і гіперемії в ділянці запалення, підвищення температури тіла, нормалізації підвищеної здатності крові до згортання, позитивної динаміки антиоксидантного потенціалу, показників активності протеаз та інгібіторів протеолізу [8, 148].

Комплексне використання сеансів ГТ та імуномодулюючих препаратів показує позитивний ефект при лікуванні хронічного тонзиліту асоційованого з синдромом вторинного імунодефіциту в вигляді частих загострень, призводить до зниження кількості рецидивів. МП при цьому виконує функцію деконгестії, а також виділяє комплекс БАР, які мають протизапальну, імуномодулюючу та деблокуючу мікроциркуляцію дії. Після сеансів ГТ відновлюється фагоцитарна та секреторна функцій поліморфноядерних лейкоцитів, а також незначне зниження кількості зрілих імунних клітин — CD3+, CD4+, CD8+ і підвищення CD20+ лімфоцитів. Підвищується спонтанна проліферація мононуклеарних клітин периферичної крові і зростає стимульована, що веде до деякого збільшення коефіцієнту стимуляції. Знижується концентрація ФНП- α , ІЛ-6, ІЛ-4 у сироватці крові. Також знижується спонтанна продукція ІЛ-1 та ФНП- α в культурі мононуклеарних клітин, а стимульована — зростає [8, 19].

Експериментальні дослідження системного та місцевого імунітету після сеансів ГТ, продукцію ІЛ у хворих із хронічними захворюваннями слизової оболонки рота показують, що після сеансів ГТ 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 до 1,5 років та більше (В. И. Спицына, 2005) [8, 20]. Після сеансів ГТ у хворих із верхівковим періодонтитом виражено БАР МП проявляють дезінтоксикаційний, протизапальний, протибольовий та деконгестивний вплив. Протизапальна дія після сеансів ГТ підтверджується даними цитологічного дослідження змішаної слини: зниженням показників цитозу та абсолютного вмісту нейтрофілів; підвищення вмісту лізосомально-катіонних білків у нейтрофілах, що свідчить про нормалізацію стану їх кисневонезалежної системи та активацію механізмів місцевого неспецифічного імунного захисту (Е. В. Денискина, 2003) [8, 13].

Експериментально доведено лімфостимулюючий вплив живої МП та настою листя брусниці звичайної на інтерстиціальний гуморальний транспорт і лімфатичний дренаж тканин при реабілітації хворих ішемічною хворобою серця середнього та похилого віку (Е. П. Боровая, 2008) [8, 14].

Дослідження (О. О. Захарова, 2008) щодо патогенетичного обґрунтування БАР МП після сеансів ГТ обумовлено при лікуванні суглобової форми ревматоїдного артрити, що показали позитивний її вплив на стан ендотеліальної функції, антиоксидантного захисту, процесів ліпопероксидації та деяких цитокінів і клінічний перебіг захворювання. До сеансів ГТ у даної групи хворих відмічалось погіршення стану ендотеліальної функції, збільшення продукції прозапальних (ІЛ-1 β , ФНП- α) і зниження концентрації протизапального цитокінів (ІЛ-4) [8, 22].

Встановлено, ефективне використання сеансів ГТ при остеоартриті колінного суглоба. Вважають, що протизапальні речовини, що 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 (близько 1 години) та довгостроковий (до кількох місяців) знеболюючий ефект [8, 149]. 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 і БАР, щоб досягти ураженої ділянки, покращують циркуляцію крові; зменшують біль у колінному суглобі, захищають його від подальшого пошкодження через деякі медіатори запалення [8, 150].

1.1.2 Використання медичних п'явок у ветеринарії

У стародавні часи дикі водопійні тварини (зокрема копитні) вели активний пошук водоймищ, де водилися МП, входили у них та стояли, даючи змогу МП їх кусати та харчуватись їхньою кров'ю, а замість цього зі своєю слиною впускали БАР. Після чого тварини отримували полегшення фізіологічного стану і знову через деякий проміжок часу поверталися на тіж водойми, для отримання порції БАР від МП. Але сучасний спосіб тваринництва з його стійловим утриманням порушив цей позитивний взаємозв'язок [8, 151]. Результатом чого є підвищення частоти вірусних, бактеріальних та паразитарних захворювань [8, 152].

ГВ у ветеринарії застосовується при різних захворюваннях у котів, собак, коней [8, 153-160], наприклад, для лікування маститів і підвищення репродуктивної здатності у корів [35-41], при лікуванні судинних захворювань коней та інших сільськогосподарських та домашніх тварин [153-160]. Дослідження щодо ефективності сеансів ГВ при розведенні кіз показали її позитивний вплив на загальний стан (підвищення апетиту, покращення стану шерстяного покриву, зникнення тріщин на рогах та копитах), продуктивність

(масу тіла, надої) та репродуктивну здатність (кількість та масу тіла приплоду) тварин. Після сеансів ГВ у кіз відбувався міграційний перерозподіл лімфоцитів крові з тимчасовим їх депонуванням у місцях приставки МП, підвищення ФАН крові у тварини [8, 151].

Експериментальні дослідження І. С. Попової (2003) вказують на ефективність після сеансів гірудопунктури на корекцію перебігу постпологових інволюційних процесів і підвищення репродуктивної здатності у корів. Гірудопунктура не має негативного впливу на фізіологічний стан організму здорових корів, вона викликає тимчасові зміни морфологічного та біохімічного складу крові тварин. Під впливом БАР МП, приставлених на біологічно активні зони, в крові спостерігається збільшення кількості еритроцитів та гемоглобіну, базофілів, еозинофілів, альбумінів, підвищується фагоцитарна активність лейкоцитів, бактерицидна та лізоцимна активність; дещо зменшується фагоцитарний індекс, вміст лейкоцитів, сегментоядерних нейтрофілів, тромбоцитів; уповільнюється швидкість згортання крові [8, 36]. Проблему ефективності застосування ГВ у собак досліджували наступні вчені: И.С.°Попова, Л. К. Попов, С. А. Долгова (2008), О. В. Крячко, Л. А. Лукоянова (2009), Л.С. Ричапова (2017) [8, 35, 153-155]. Однією із найважливіших проблем власників тварин є інтоксикаційний синдром, який спостерігається при різних захворюваннях. Основними причинами його розвитку є фактори, що знижують природну резистентність організму тварин (поганий екологічний стан, порушення правил годування та утримання). Захворювання, що супроводжуються інтоксикаційним синдромом, потребують дорогого лікування, яке не завжди веде до одужання. Інтоксикація супроводжується реакцією всього організму: відмічається компенсаторна реакція зі сторони еритроцитарної ланки гемопоезу (збільшення вмісту гемоглобіну в еритроцитах), зі сторони лейкоцитарної ланки — реакція гранулоцитарної ланки (розвиток специфічних імунних реакцій). Обмінні процеси характеризуються станом зниженого харчування та порушенням метаболізму білка. Динаміка гематологічних показників після сеансів ГВ свідчить про

усунення запальної реакції, причому активуються як неспецифічні, так і специфічні компоненти імунного захисту [8,153].

Таким чином, супутній імуотропний ефект МП полягає, в першу чергу, в активації механізмів вродженого імунного захисту, а потім і адаптивного імунітету. Аналіз літературних джерел показав, що застосування МП у клінічній практиці експериментально виправдане, досліджено склад БАР МП, механізми їх впливу, але наступні питання залишаються не вирішеними та потребують подальшого вивчення: механізми імуотропної дії МП [8].

1.2 Біологічно активні речовини медичної п'явки

ССЗ МП містить понад 100 сполук білкової, ліпідної та вуглеводної природи: 80 компонентів фракцій із молекулярною масою понад 500 Да, 20 компонентів низькомолекулярної фракції (менше 500 Да) (Баскова, Завалова, 2001) [161], які володіють широким спектром біологічної активності [1, 8, 16]. В кінці XIX ст. J. B. Haucraft (1884) вперше отримав речовину з МП, яка перешкоджала згортанню крові — гірудин [1, 42]. Ця подія стала початком наукового етапу розвитку ГТ, але лише в 1955 р. F. Markwardt отримав гірудин у чистому вигляді. ССЗ МП являє собою складну комбінацію БАР, але вивчені ще не всі, що пов'язано зі складнощами його отримання. Відомі на сьогодні методи отримання ССЗ МП (J. B. Haucraft, S. Apathi, I. П. Баскова та Г. І. Ніконов, M. Rigbi) не дозволяють повною мірою відобразити реальний склад секрету залозистих клітин, бо містять домішки речовин, що продукуються травними залозами п'явки та її мікрофлорою [1, 8]. Метод запропонований О.°Ю. Каменевим дозволяє цього уникнути [162]. О. Ю. Каменев (2007) виділяє 4 групи БАР МП у відповідності до вирішення різних завдань та динаміки їх виділення при укусі: першими секретуються літичні сполуки (руйнування тканин і мікросудин жертви), антигемостатики (блокада механізмів гемостазу), блокатори захисних реакцій організму (протидія запальним реакціям, що

розвиваються в тканинах у відповідь на пошкодження) та допоміжні речовини [1, 8, 162].

1.2.1 Літичні сполуки

Сполуки, які забезпечують проникнення речовин слини, руйнування тканин жертви, розширення рани, розплавлення мікросудин, впливають на проникність міжклітинного матриксу дерми. При фракційному зборі слини, в процесі харчування МП, речовини даної групи виявляють лише в перших і середніх порціях секрету, останні порції їх не містять. Дана група включає: пептидазу (дестабілазу), гіалуронідазу, колагеназу [1, 8].

1) Пептидаза (дестабілаза) — це фермент, що руйнує певний тип зв'язків у молекулі білка — ϵ -(γ -глутаміл)-лізинові-ізопептидні зв'язки, які утворюють поперечні зшивки («крос-лінкінги») [162-164], 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, 165]. 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 [166]. Лізоцимна активність спостерігається не лише у *H. medicinalis*, а й у інших видів родини *Hirudinea*: *Herpobdella octoculata*, *Hemopsis sanguisuga* [8, 167].

2) Гіалуронідаза — фермент, що каталізує реакції гідролітичного розщеплення і деполімеризації гіалуронової кислоти і споріднених із нею сполук — кислих мукополісахаридів [1, 16, 168]. Враховуючи, що глікозаміноглікани 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, 165]. У складі слини МП виявлені 2 гіалуронідази, які відрізняються за здатністю впливати на хондроїтинсульфат [1, 8].

3) Колагеназа викликає гідроліз волокон колагену I типу і подібна до колагенази людини. Можливо, бере участь у інгібіції колаген-індукованої агрегації тромбоцитів [1, 8]. Гіалуронідаза та колагеназа — ферменти, які збільшують проникнення до організму різних речовин, також виконують бактерицидну та бактеріостатичну дію [8, 168].

1.2.2 Антигемостатики

Група речовин, які перешкоджають розвитку механізмів згортання крові, забезпечують вільний відтік крові з пошкоджених судин протягом всього періоду харчування МП. Антигемостатики починають виділятися із моменту руйнування мікросудин і появи крові в ранці, тому виявляються в середній фракції слини. Потрапляючи з кров'ю в кишечник МП підтримують її в рідкому стані. У складі ССЗ МП виявлені речовини, що блокують всі основні механізми активації системи згортання крові (первинний і вторинний). До них відносять: калін, апіраза, антагоніст PAF, інгібітор Ха фактора, гірудин.

1) Калін — інгібітор адгезії та агрегації тромбоцитів, активації фактора Вілебранда, молекулярна маса — 65 кДа [1, 8, 165].

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

3) Антагоніст PAF (фактору активації тромбоцитів) — перешкоджає адгезії та активації тромбоцитів, міграції тромбоцитів і нейтрофілів до вогнища ураження [1, 8, 169], а також скороченню гладенько-м'язових клітин. PAF — 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 нанесення ранки, ініціює гемостаз та запальну реакцію [1, 8].

4) Інгібітор Ха фактора (FXaI — factor Xa inhibitor) — у каскаді білків плазменного гемостазу фактор Ха є ферментом, що каталізує перетворення протромбіну в тромбін у присутності іонів Ca^{2+} , фактора згортання крові V на поверхні мембран активованих тромбоцитів чи фрагментів зруйнованих ендотеліальних і/або гладенько-м'язових клітин (інколи фактор Ха називають протромбіназою). Синтезований рекомбінантний FXaI, який здійснює захисний вплив проти венозного тромбоутворення [1, 8]. Відіграє важливу роль при лікуванні остеоартриту і ревматоїдного артрити [128].

5) Гірудин — унікальний високоспецифічний інгібітор ферменту тромбіну, він блокує всі відомі реакції, активатором яких виступає тромбін [1, 16, 42, 165]: активацію фібриногену і перетворення його в нерозчинний фібриновий згусток; регуляцію V, VIII, XIII факторів згортання; регуляцію компонентів системи комплементу; зміни функціонального стану клітин крові (моноцитів, нейтрофілів), у тому числі і агрегацію тромбоцитів; зміни стану ендотеліальних та гладенько-м'язових клітин кровоносних судин. Методами генної інженерії отриманий рекомбінантний гірудин і фармацевтичний препарат на його основі [1, 8, 16, 42].

1.2.3 Блокатори запальних реакцій організму

Речовини поліпептидної природи, що слугують інгібіторами ферментів, продукуються різними клітинами організму в ході реакції-відповіді на пошкодження шкіри [1, 8]. В літературі роль цих речовин пов'язують з інгібуванням процесів перетравлення білків у кишечнику МП. Припускають, що речовини даної групи виконують захисну функцію, перешкоджаючи пошкодженню внутрішніх структур п'явки ферментами, що виділяються у вогнищі пошкодження і потрапляють у кишечник зі з'їденою кров'ю. Вважають, що в процесі вилучення крові вони блокують прояви захисної

запальної реакції організму (розвиток спазму, набряку, болю та ін.) із метою забезпечення харчування тварини. Речовини даної групи виявлені в середніх та особливо останніх фракціях слини, де вони присутні в максимальних концентраціях. Деякі з них (наприклад, гірустазин) мають значення і для блокування системи гемостазу.

1. Бделіни — група поліпептидів із невеликою молекулярною масою, серед яких виділяють бделіни А з молекулярною масою 7 кДа і бделіни В із молекулярною масою 5 кДа. Методом рівновагової хроматографії виділені численні форми бделінів А і В; які позначені від А1 до А6 і від В1 до В6 [1]. Вони є сильними інгібіторами трипсину, плазміну [1, 8, 16], акрозину сперми [1, 8, 165]. Вони не блокують активність хімотрипсину, тканинного та плазменного калікреїнів, субтилізіну. Отримана рекомбінантна форма бделастиазину [1, 8].

2. Гірустазин — належить до тієї ж родини антистазинових інгібіторів серинових протеаз [1, 8], молекулярна маса становить 5,9 кДа, він інгібує тканинний калікреїн, трипсин, хімотрипсин, катепсин G нейтрофілів [170]. 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. Отримана рекомбінантна форма [1, 8].

3. LDTI (leech derived tryptase inhibitor) — інгібітор триптази, отриманий із екстракту МП [171]. Триптаза є основним компонентом секреторних цитоплазматичних гранул мастоцитів і приводить до руйнування білків екстраклітинного матриксу. Відома роль триптази при алергічних та запальних реакціях. Отримана рекомбінантна форма [1, 8].

4. LCI (leech carboxypeptidase inhibitor) — інгібітор карбоксипептидази А, існує 2 ізоформи з молекулярною масою 7,3 та 7,2 кДа. Стійкий у широкому діапазоні рН та температур. LCI знаходиться в складі ССЗ МП, припускають, що він здатен блокувати гідроліз кінінів металопротеїназами у місці укусу

шкіри МП, посилюючи індуковане кінінами збільшення кровотоку. Створена рекомбінантна форма [1, 8].

5. Егліни — низькомолекулярні білки з екстрактів МП із молекулярними масами 8,073 та 8,099 кДа («b» і «с» форми відповідно). Інгібують активність α -хімотрипсину, хімази мастоцитів, субтилізину та нейтральних протеїназ нейтрофілів: еластази і катепсину G [1, 8, 172]. Мають високу стійкість до денатурації та прогрівання. Інгібіторний спектр егліну «с» дозволяє вважати його одним із найважливіших протизапальних агентів. Але є підстави вважати, що егліни, які виділені з МП, не присутні в ССЗ, а продукуються шлунковою залозою [1, 8]. Біологічна цінність еглінів залежить від їх здатності блокувати активність лейкоцитарних протеаз, що вивільняються при запальних реакціях [8].

1.2.4 Допоміжні речовини

Речовини, які сприяють стабілізації, захисту, транспортуванню, посиленню дії інших компонентів ССЗ МП [1, 8]. Наявність у ССЗ великої кількості ліпідів дозволяє зробити припущення про можливість формування ліпідно-ферментних комплексів, в яких молекули білка чи їх 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 ССЗ МП. Про можливість утворення складних комплексів у слині п'явки вперше повідомив Г. І. Ніконов. Він припустив, що в ССЗ МП наявні ліпосоми [1, 8]. Ліпосома п'явок — перший приклад такої структури природного походження. Її компоненти — дестабілаза, стабільний аналог простацикліну, 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 не виявили в нативній слині ліпосоми. Але ліпіди слини мають велику молекулярну масу і являють собою незвично довгі для ліпідів ланцюги, що утворюють спіраль із активними групами на кінцях, що підтверджує можливість формування складних просторових утворень [1, 8].

Окрім вищевказаних МП продукують велику кількість інших сполук: колагеназа, кініназа, кініногеназа, ліпази, простагландини [8, 40], ацетилхолін, гістаміноподібні судинорозширювальні сполуки, які подовжують час кровотечі, ферменти, які знижують утворення рубцевої тканини і спайок (фібриназа, колагеназа) [165, 173] антибіотики (хлороміцетин) [128], анальгетикоподібні речовини [128, 174]. Оригінальні дослідження І. П. Баскової та ін. (2008) доводять наявність у ССЗ МП стероїдних гормонів (прогестерон, тестостерон, естрадіол, дегідроепіандростерон, кортизол) та важливих нейромедіаторів (гістамін, серотонін). Так, серотонін — регулятор харчової поведінки МП, а гістамін викликає вазодилатацію судин мікроциркуляції. Можливо, він із серотоніном викликає місцеву алергічну реакцію поблизу ранки, після укусу МП [8, 175]. Однак, очевидно, що спектр БАР ССЗ МП все ще залишається недостатньо вивченим. Залишається недостатньо вивченою антигенна схожість БАР МП різних видів, яких використовують для ГТ. Так, порівняння складу білків і пептидів ССЗ МП видів *H. verbana*, *H. medicinalis* і *H. orientalis*, показало, що 30-40% індивідуальних мас ССЗ кожного виду п'явок припадає на частку мас, що містяться в ССЗ хоча б одного з двох інших видів. Мала частка загальних мас може свідчити про високий поліморфізм амінокислотних послідовностей або високу частоту посттрансляційних модифікацій білків і пептидів ССЗ. При цьому встановлено, що *H. medicinalis* і *H. orientalis* є найбільш близькими між собою за складом ССЗ, що відповідає даним літератури про філогенетичну спорідненість цих видів п'явок [8, 176]. Окрім вищевказаних ССЗ МП, вона виділяє в оточуюче середовище, зокрема кондиційоване середовище утримання МП, разом із продуктами

життєдіяльності (гуано, сеча, слиз, злущені залишки кутикули та ін.) так звані, екзогенні БАР. Оригінальні дослідження К. В. Рассадіної (2006) показують, що до складу важливих метаболітів, які продукуються МП у навколишнє середовище входять речовини з високою біологічною активністю, зокрема: білки сироватки крові годувальника — альбуміни і глобуліни, гірудин, ферменти: гіалуронідаза, тригліцерідаза, еластаза, апіраза. До метаболітів МП також входять 19 амінокислот (у найбільших концентраціях: триптофан, глютамінова кислота, аланін, лізин, лейцин), біогенні елементи — калій, натрій, фосфор і мікроелементи (селен, йод, бром, сірка). Тому, вода, оброблена МП, містить комплекс БАР, до яких входять: білки плазми крові, незамінні амінокислоти, знеболюючі та протизапальні речовини, біогенні елементи, мікроелементи. Така вода не несе біологічної небезпеки, бо є нетоксичною (підтверджено дослідями на білих мишах), не містить патогенної мікрофлори, і за пропозицією К. В. Рассадіної (2006), дозволяє рекомендувати її використання з лікувальною метою [8, 177]. В народній медицині, ветеринарії використовують води, оброблені МП, для лікування запальних процесів, шлунково-кишкових захворювань, дерматологічних захворювань [8, 177]. При дослідженні МП [178-180] показали, що БАР МП проявляють бактеріостатичну дію, подібну до антибіотиків. Так, при аналізі впливу екзогенних БАР МП на пігментоутворювальні сапрофітні бактерії (*Serratia marcescens*, *Azotobacter chroococcum*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. iodium*) виявлено пригнічення пігментоутворення та зміну морфології бактеріальних клітин (укорочення розміру бактерій) [8, 179]. Встановлений бактеріостатичний ефект МП обумовлений наявністю в ньому БАР з антимікробною дією (наприклад, гіалуронідаза, колагеназа) [40], а також антибіотика (хлороміцетин), який виділяє МП [128]. Враховуючи результати проведених всіх досліджень, а також пристінкове розміщення бактерії-ендосимбіонту МП — *A. hydrophila* [181], дослідники вважають, що, екзо- та ендосимбіонти МП не можуть бути джерелом бактеріологічних ускладнень при ГВ [8, 168-180]. Також досліджено вплив БАР МП на рослинні (*Cucumis sativus*) [182] та тваринні (*Daphnia magna*) об'єкти

[183]. Так, у тесті гострої летальної токсичності на нижчих ракоподібних (*Daphnia magna*) встановлено токсичний та стимулюючий ефекти [184]. Також встановлена опосередкована причина летальності через виявлену дослідниками бактеріостатичну дію БАР МП [8, 178-180, 184], що може спричинити порушення мікробного симбіоценозу, наприклад кишечного.

1.3 Основні вікові особливості імунної реактивності щура

1.3.1 Загальна характеристика крові щура

Загальна кількість крові у лабораторного білого щура в середньому становить близько 7,5 % від маси тіла. Вміст гемоглобіну становить — 60–80 г/л. Кількість еритроцитів — $5-6 \times 10^{12}$ /л. Еритроцити крові досить великих розмірів (5,7–7,0 мкм), у периферійній крові часто виявляються поліхроматофільні форми (близько 5 % від їх загальної кількості у дорослих тварин, а в період новонародженості — більша частина). Кількість ретикулоцитів: у дорослої тварини 3–4,6 %, у новонароджених — 91–96 %. Тривалість життя еритроцитів близько 8 днів. Кількість лейкоцитів у крові дорівнює $(7,3-14,3) \times 10^9$ /л. Дослідження гематологічних показників, проведені різними авторами в різні роки, не мають принципових відмінностей. Ядро гранулоцитів (еозинофілів і нейтрофілів) розвивається за кільчастим типом, тому серед юних і паличкоядерних гранулоцитів нерідко виявляються кільцеподібні форми. Базофільні гранулоцити великих розмірів, мають блідо забарвлену сірувато-блакитну цитоплазму з рідко розташованими в ній базофільними гранулами різного розміру. Ядро неправильної форми, сферичне чи посегментоване, дуже блідо фарбується за рахунок переважання еухроматину. Еозинофільні гранули дрібні, округлі, густо виповнюють цитоплазму. Зернистість нейтрофільних гранулоцитів дуже дрібна, проте добре помітна на фіксованих і забарвлених за Паппенгеймом мазках крові. Агранулоцити (лімфоцити та моноцити) мають типовий вигляд. Біла кров

щурів надзвичайно лабільна. У двох здорових тварин одного віку і навіть у однієї і тієї ж тварини відмічаються значні коливання співвідношення між окремими видами лейкоцитів. Слід зауважити, що кров білих щурів підлягає помітним сезонним коливанням. Так, в осінньо-зимовий період збільшується загальна кількість лейкоцитів, еритроцитів, тромбоцитів, проте кількість гемоглобіну найвища навесні. Про стан кровотворення свідчить клітинний склад пунктату червоного кісткового мозку. Показники клітинного складу кісткового мозку, як і периферійної крові, досить варіабельні. Лейкоцитарна формула крові білих щурів у %: базофіли 0; еозинофіли 0,8–5,0; нейтрофіли - юні 0, паличко ядерні 0,1–0,7; сегментоядерні 13,7–30,26; лімфоцити 44,06–97,94; моноцити 1,6–5,2. Клітинний склад кісткового мозку білого щура у %: мієлобласти 2,5; промієлоцити 4; мієлоцити: нейтрофільні 23, ацидофільні 65; метамієлоцити: нейтрофільні 37, ацидофільні 5; лімфоцити 3; моноцити 2; еритробласти 12 [185].

1.3.2 Особливості зміни імунологічних показників крові імунної системи щура з віком

Із ключових позицій в імунній системі належить фагоцитозу, який не тільки розглядається, як протиінфекційний імунітет, а і як універсальний ефектор гомеостазу [186]. В.Г. Овсяніков (2008) досліджуючи особливості лейкоцитарної реакції та фагоцитозу крові білих нелінійних щурів-самців різних вікових груп при гострій соматичній болі виявив, що у тварин інтактної групи щурів різного віку зміни лейкоцитарного профілю та фагоцитарної ланки імунітету, які відображають основний принцип розвитку цих систем в ході постнатального онтогенезу, згідно з якими кожному віковому періоду відповідають свої закономірності цитоструктури білої крові і її функціональної активності в здійсненні фагоцитарних реакцій [186]. У новонароджених щурів високі фонові показники всіх фракцій лейкоцитів. Як відомо, фізіологічний та реактивний лейкоцитоз новонароджених є універсальним феноменом, роль

якого, на погляд Овсянікова, полягає перш за все в компенсації низької функціональної активності незрілої лейкоцитарної системи, що дозволяє забезпечити необхідний рівень біологічного захисту організму в період адаптації до умов позаутробного існування. Відомо, що в ранньому віці нейтрофіли та моноцити не справляються з завершальною фазою фагоцитозу, що пояснює високий ризик виникнення септичної патології у немовлят. У інтактних місячних щурів на тлі фізіологічної лейкопенії та зменшенню відсоткової частки паличкоядерних нейтрофілів та моноцитів, щодо неонатального періоду, відзначається тенденція до підвищення активності фагоцитарної ланки, в основному за рахунок збільшення поглинальної здатності фагоцитів. Це дозволяє стабілізувати фагоцитарну ємність крові, незважаючи на значну редукцію загального фагоцитарного пулу та низький відсоток фагоцитуючих лейкоцитів. У дорослих статевозрілих щурів при підвищенні фонових показників всіх компонентів лейкоцитарного профілю значно посилюється фагоцитарна ланка за рахунок зростання загального пулу фагоцитів, підвищення в ньому відсоткової частки моноцитів, збільшення фагоцитуючих лейкоцитів і їх поглинальної здатності [186]. Е.Ю. Бессалова (2011) аналізуючи показники лейкоцитарної формули крові у статевозрілих нелінійних щурів (самок та самців) отриману із хвоста показала, що у нормі у щурів відсутні сезонні, статеві і циклічні відмінності показників лейкоцитарної формули крові, що відображають їх загальний адаптаційний статус організму – вміст нейтрофілів, лімфоцитів та їх співвідношення. Показники лейкоцитарної формули відрізняються у щурів першого та другого року життя внаслідок розвитку вікових змін, у самців у віці 15 місяців ці процеси більш виражені, ніж у самок [187]. За Бессаловою найбільш лабільною клітинної популяцією є нейтрофіли, що несуть потужний рецепторний та ефекторний потенціал в здійсненні реакцій гомеостазу [187]. Е. Є. Нурашева (2015) досліджуючи метаболічну та поглинаючу активність нейтрофілів молодих та старих білих самців щурів виявила, що метаболічна та поглинаюча активність нейтрофілів у старих щурів порівняно з молодими тваринами знижується [188].

1.4 Вікові особливості будови лімфоїдних органів імунної системи: селезінки та тимусу щура.

1.4.1 Особливості морфологічної будови тимусу здорових щурів із віком

Тимус – є одним з основних первинних органів імунної системи, як первинний орган імунної системи багато в чому визначає не тільки стан вторинних органів імуногенезу, але і виражає захисну реакцію усього організму. Разом з тим, він активно реагує на екзогенний та ендогенний вплив, що проявляється у зміні його будови та функції [189-195]. У більшості робіт, присвячених вивченню тимусу лабораторних щурів, які є одними з найбільш часто використовуваних тварин для вивчення пошкоджуючої дії фізичних, хімічних і біологічних впливів, в основному висвітлюються питання гістології та гістохімії органу без урахування статі, віку та варіантної морфології загруднинної залози як органу в цілому [194-197]. Відомо, що тимус людини та білого пацюка, та у їх новонароджених, складається з різного числа часток [198-202]. П. В. Пугач [203] стверджує, що в умовах норми тимус має 3 частки у 21,8 % новонароджених щурів, причому додаткова частка завжди ліва. Він пояснює походження трьох долей тимусу, посилаючись на літературні дані, в Т. Б. Петрової [204], що формування зачатків тимусу у зародків щурів починається на 5-7-му добу та закінчується до 12-13 доби. На думку Пугача в цей період закладається кількість часток тимусу. Але Петрова вважає інакше, у ембріонів білого пацюка на 12-13 добу вона знайшла зачаток тимусу (1-ша стадія його розвитку) у вигляді епітеліальних тяжів по обидві сторони від глотки. На 5-7-му добу утробного життя білого пацюка припадає кінець до імплантаційного періоду (стадія бластогенезу), початок нідації бластули в ендометрій та гастрюляції. А. А. Пасюк та П. Р. Пивченко [205] вперше виявили зачатки тимусу на 10-ту добу ембріогенезу щура у вигляді парного скупчення клітин ентодерми вентральних відділів третіх глоткових кишень, на 14-ту добу до них приєднуються клітини ектодерми цервікального синусу. Методом

препарування [202] дослідниками зареєстровано, що у білих щурів тимус складається з безлічі дійсних часток, до 4 правих та 4 лівих – парні краніальна, середня, каудальна та дорсолатеральна. На кордонах між першими трьома проходять тимічні гілки внутрішньої грудної артерії. Дорсолатеральна частка відділяється від решти тимусу нервово-судинним пучком. У його склад входять діафрагмальний нерв, перикардіодіафрагмальні артерія і вена. Дослідник пояснює механізм поділу правого та лівого тимусу (помилкові частки) на дефінітивні справжні частки органу у плодів білого пацюка. Він звернув увагу на той факт, що в еволюції довгий час (до птахів включно) тимус розташовувався в області шиї у вигляді правого та лівого тяжів, їх фрагментів. У ссавців тимус цілком або здебільшого розміщується в грудній порожнині, де розширюється і стає непарним [206-208]. З моменту народження тимус розташовується за грудиною в вентральному середостінні, його топографія змінюється у зв'язку з зростанням тимусу та інших органів. До вентральної поверхні тимусу у всіх випадках прилягають грудино-під'язиковий та грудино-щитовидний м'язи, тіло грудини і парієтальна плевра. Дорсальною поверхнею тимус прилягає до трахеї, до правої і лівої внутрішніх яремних вен, правої і лівої безіменних вен, поворотного гортанного нерву, дузі аорти і перикарду. У віці від 2-х до 4-х місяців тимус, дорсально охоплює прикардіальні судини. У щурів віком до трьох тижнів каудальний полюс досягає рівня третього міжребір'я. У віці від 3-х тижнів до 2-х місяців він простягається до рівня четвертого міжребір'я. До 3 місяців каудальний полюс досягає свого дефінітивного положення: рівня третього міжребір'я та до 4 місяців прикриває обидва вушка передсердь практично повністю, а в ряді випадків досягає шлуночків серця. З 6 місяців каудальний полюс зазвичай не опускається нижче рівня вушка правого передсердя. У 9% випадків спостерігається проникнення правої частки залози між вушком правого передсердя та правим шлуночком серця. Краніальний полюс у віці до 3 місяців незначно виступає над рівнем яремної вирізки грудини, що в більш пізньому віці спостерігається рідко. У 8,6% випадків краніальний полюс однієї з часток переходить у тонкий тяж, що

триває вгору до рівня нижнього краю щитоподібної залози. До латеральним поверхонь органу прилежать внутрішні яремні вени, парієтальна плевра, лімфатичні вузли і велике скупчення жирової клітковини, обсяг якого наростає з першого по шостий місяць. Тимус оточений капсулою, яка вентрально переходить на груди́ну, каудально триває перикардо-груди́ну зв'язку, а в краніальному напрямі зливається з фасціями шиї і у вигляді сполучнотканинного тяжа спрямовується вздовж трахеї до дорсолатеральним відділам щитовидної залози. Максимальну середню масу тимус має до 3 місяців життя, до шестимісячного віку вона залишається стабільною, пізніше знижується. Відносна маса його досягає максимуму до 3 тижнів і потім знижується. При аналізі темпів зростання маси часток встановлено, що максимальний темп зростання маси залози має у віці до двох тижнів, а потім прогресивно знижується, проте на 2 та 5-му місяцях спостерігається його збільшення. Максимальне зниження тему росту об'єму тимусу зареєстровано на 2 році життя тварини. В постнатальному онтогенезі білого щура зміни об'єму тимусу мають хвилеподібний характер: перший період прискореного росту – перші 2-3 тижні розвитку; другий період прискореного росту – 2-й місяць розвитку. На протязі 3-4-го місяця зареєстрований період повільного росту, який пов'язаний з статевим розвитком щура. Третій період швидкого росту 5-й місяць розвитку, а з 6-го місяця зареєстрована швидка інволюція тимусу, яка пришвидшується на 2-му році життя. Дані морфометричних вимірювань свідчать, що частки тимусу ростуть переважно в краніокаудальному напрямку (довжини), а після 6-го місячного віку зменшуються переважно по ширині. Об'єм залози збільшується з моменту народження до трьох місяців постнатального онтогенезу, а з 6 місяців знижується. Темп зростання максимальний протягом першого тижня, потім поступово зменшується, а на 2-3-му місяці спостерігається його збільшення. Джерела артеріального притоку до тимусу розділяються на основні та додаткові. До основних відносяться гілки внутрішньої грудної артерії, які у вигляді одного ствола направляються з кожної сторони до відповідної частки з

латеральної поверхні її середнього відділу, де у більшості випадків поділяються на краніальну та каудальну гілки. Діаметр артерій досягає максимуму до 6 місяців. Темп зростання артерій залишається стабільним з невеликим збільшенням у віці двох тижнів та двох місяців. Додатковими джерелами кровопостачання тимусу є гілки від загальної сонної артерії, які простежуються до краніального полюса відповідної частки. Іноді спостерігаються гілки від правої загальної сонної артерії, які слідуєть до обох часток органу. Крім того, зустрічаються тонкі гілки від перикардо-діафрагмальної артерії, які входять до латеральної поверхні часткою тимусу. Венозний відтік здійснюється з внутрішньо-органних сплетінь часток декількома стволами, які топографічно розділяються на краніальні, середні та каудальні тимічні вени. Краніальні вени починаються від краніальних полюсів та впадають у внутрішню яремну або каудально-щитовидну вени. Середні тимічні вени, починаються зазвичай від латеральних частин органу і впадають у внутрішню грудну та ліву безіменну вени. Каудальні вени беруть початок від каудального полюса органу і впадають у перикардо-діафрагмальну та середостінні вени. Середня група вен зустрічається найбільш постійно, краніальна та каудальна групи часто відсутні. Відзначаються анастомози між венами обох часток. Ширина вен поступово збільшується до 6 місяців. Темп зростання вен мінімальний в віці 5 місяців та максимальний до 6 місяців [209-210].

1.4.2 Вікові особливості зміни морфологічної будови селезінки щурів

У зв'язку з інтенсивним розвитком імунології неухильно зростає інтерес морфологів до вивчення будови селезінки, як важливого вторинного органа імунної системи [211-214]. Проблема зниження імунологічної реактивності населення становить інтерес для біологів і лікарів практично всіх спеціальностей, оскільки в даний час в більшості хворих із соматичною, хірургічної та гінекологічної патологією виявляється імунодефіцит, виражений в тій або іншій мірі. Імунна недостатність проявляється порушенням

функціонування клітинної та гуморальної ланок імунітету та виникає в результаті впливу на організм різних негативних факторів. На сьогоднішній день однією з основних причин розвитку пренатальних форм імунодефіцитів вважається порушення імунного гомеостазу у матері під час вагітності [215]. Навіть відносно слабкі впливи негативних факторів, які, здавалося б, не повинні викликати структурні та функціональні зміни у органах, в підсумку призводять до порушень нейроендокринних і нейрохімічних механізмів регуляції [216]. Процеси нормального росту та розвитку як плоду, так і дитини після народження перебувають у центрі уваги фахівців різних галузей, що займаються вивченням морфогенезу, в процесі якого формується чітко детермінована ознака, характерна для даного віку. Перебіг процесів проліферації, диференціювання та апоптозу клітин відбувається послідовно. Під контролем нейро-ендокринно-імунної системи формуються тканини, органи та системи органів. Сприятливий результат вагітності та пологів, а також здоров'я новонародженого в значній мірі залежить від впливу зовнішніх та внутрішніх (спадкових) чинників. В антенатальному періоді домінує внутрішній фактор, а вплив зовнішнього опосередковуються материнським організмом [217]. До одного з таких факторів можна віднести видалення селезінки у майбутньої матері ще до настання вагітності. Доведено, що видалення селезінки призводить до розвитку акцидентальної інволюції тимусу та пригнічення імунітету [218]. Хоча з іншого боку і сама вагітність є фізіологічним імунодефіцитним станом: навіть у здорової вагітної жінки спостерігається знижена стійкість до інфекцій і загострення симптоматики аутоімунних захворювань [219]. Вагітність, яка виникла у стані вторинного імунодефіциту, чинить негативний вплив на здоров'я не тільки матері, але і її потомства. Безсумнівно, проблема антенатальної охорони потомства на сьогоднішній день є актуальною, особливо на тлі прогресуючого зниження дитинонародження і демографічних показників, збільшення перинатальної патології та захворюваності новонароджених. Складна анатомічна будова структурних компонентів її білої пульпи, що включають періартеріальні

лімфатичні півхи, що є тимусзалежними утвореннями, і лімфатичні вузлики, які мають як Т-, так і В-зони, створює сприятливі умови для кооперації клітин в імунній відповіді [219-222]. Дослідження будови селезінки в ранньому постнатальному періоді онтогенезу є актуальним у зв'язку з широким розповсюдженням імунодефіцитних станів у дітей [223]. Селезінка щура має подібну з органом людини гістоструктуру [214]. Відомо, що до 10 діб постнатального періоду в її білій пульпі з'являються обриси маргінальної зони, а до 15 діб утворюються поодинокі первинні лімфатичні вузлики [224, 225]. До 30 діб після народження орган щурів демонструє дефінітивну мікроструктуру з наявністю вторинних лімфатичних вузликів з гермінативними центрами [214, 225]. У підсосному віці у щурів відзначаються ознаки інтенсивного росту та морфофункціонального розвитку селезінки, які полягають в поступовому зростанні органометричних показників органу та морфометричних параметрів білої пульпи. До завершення підсисного віку (21 доба після народження) відбувається якісне перетворення паренхіми селезінки у вигляді формування зрілих вторинних лімфатичних вузликів та зон періартеріальних лімфатичних півх, що означає настання функціональної зрілості імунного апарату органу [222]. У статевонезрілих щурів (віком 30 діб) поряд з первинними лімфоїдними вузликами починають визначатися одиничні вторинні вузлики, з центрами розмноження. Вони відрізняються більшими розмірами і більш широкою маргінальною зоною. До 45-денного віку обсяг білої пульпи помітно збільшується, так само як і маргінальної зони. В червоній пульпі зрідка зустрічаються поодинокі мегакаріоцити. У червоній пульпі багато макрофагів. До 60-денного віку (вік статевого дозрівання), у білій пульпі лімфоїдні вузлики починають переважати над періартеріальними лімфоїдними муфтами (ПАЛВ). До цього часу мікроархітекtonіка селезінки має складну будову, з розгалуженими ПАЛВ, до яких з певною періодичністю прикріплюються лімфоїдні вузлики. У вузликах можуть бути присутніми макрофаги з нефарбованою цитоплазмою, заповнені апоптозними тільцями [223]. Всі структури білої пульпи мають чіткі контури і правильну форму. До цього віку

межіндивідуальні відмінності в малюнку мікроархітекtonіки селезінки визначаються найпомітніше. До 3-х місячного віку у молодих статевозрілих тварин від капсули всередину органу відходять помітні сполучнотканинні перегородки. У лімфоїдних вузликах збільшується число макрофагів з незафарбованою цитоплазмою, заповненою апоптозними тільцями. У лімфоїдних вузликах, а також в червоній пульпі визначаються плазматичні клітини. У віці 6-ти місяців, відповідному середнього віку, триває огрубіння стромі: сполучнотканинні перегородки стають товщі, капсула грубіше. У білій пульпі продовжує збільшуватися число макрофагів з нефарбованою цитоплазмою, які тепер визначаються не тільки в лімфоїдних вузликах, як в 3-місячному віці, а й у ПАЛВ. Збільшується кількість макрофагів і в маргінальній зоні, і в червоній пульпі. Мікроархітекtonіка в даній віковій підгрупі значно різниться, що є відображенням індивідуального антигенного навантаження тварини. Ці індивідуальні відмінності включають об'ємне співвідношення Т-і В-зон, білої пульпи і маргінальної зони, обсяг селезінкових тяжів, рівень апоптозу лімфоїдних клітин у білій пульпі, непрямим показником якого є кількість апоптозних тілець в макрофагах з нефарбованою цитоплазмою, які захопили їх. У 9-ти місячному віці, який більшістю дослідників визначається як старіючий, в селезінці вже на рівні якісного дослідження визначаються зміни, що свідчать про початок вікової інволюції лімфоїдної тканини селезінки, які полягають у зменшенні обсягу маргінальної зони, розрідженості лімфоїдних вузликів і ПАЛВ, формуванні у них розмитих контурів неправильної форми, практичному зникненні вторинних лімфоїдних вузликів, фіброзування стромі органу [225].

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Дослідні тварини

Лабораторні щури. Експериментальні дослідження виконано на білих нелінійних лабораторних щурах. У дослідженнях було використано 80 нелінійних щурів – самиць (віком 4 місяців, середньої маси $200 \pm 17,5$ г) та їх приплоду ($n=400$) в динаміці онтогенезу: на 1, 15, 30, 45 та 60-ту добу. Терміни проведення досліду приплоду були обрані з урахуванням загальновизнаної 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 [200, 201]. Для дослідження використовували тварин, які пройшли карантинний режим та не мали зовнішніх проявів захворювань. Тварин утримували в спеціалізованому віварії біологічного факультету «Запорізький національний університет» у стандартних пластмасових клітках при природному й додатковому штучному освітленні (з 8:00 до 17:00) при температурі 22-24 °С. Тварин годували збалансованим комбікормом. Вони мали вільний доступ до питної води та до їжі. Маніпуляції з тваринами проводили 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) [226], Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» [227]. Отримано позитивний висновок комісії з біоетики біологічного факультету «Запорізький національний університет» МОН України (протокол № 1 від 22 березня 2018 р., голова комісії — доктор біологічних наук, професор О. А. Бражко). Дослідження здійснювали в один і той же час доби о 12 годині.

Медичні п'явки. В експеримент взято 150 голодних товарних МП аптечного виду (*Hirudo verbana* Carena, 1820) віком 7-8 місяців, вирощених на базі навчально-науково-дослідної лабораторії клітинної та організменної біотехнології «Запорізький національний університет» (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 було 4 місяці тому. МП утримували в 3-х літрових бутлях із дехлорованою відстояною водогінною водою об'ємом 2 л (по 15-25 осіб) при температурі оточуючого середовища +22-24°C [228].

2.2 Схеми експериментальних досліджень

Дослідження загальних імунотропних ефектів МП *Hirudo verbana* проводили в два етапи:

I етап — дослідження імунотропних ефектів слини МП *Hirudo verbana* в експерименті на лабораторних нелінійних білих щурах-самицях та їх приплоді в динаміці онтогенезу: на 1, 15, 30, 45 та 60-ту добу за гірудовпливу.

II етап — вивчення імунотропних ефектів стандартизованого водно-сольового екстракту з тканин МП в експерименті на нелінійних білих лабораторних щурах-самицях та їх приплоді в динаміці онтогенезу: на 1, 15, 30, 45 та 60-ту добу .

2.2.1 Схеми дослідження імунотропних ефектів слини медичної п'явки *Hirudo verbana* в експерименті на лабораторних щурах за гірудовпливу

В експеримент взято 40 лабораторних нелінійних білих щурів-самиць та їх приплоду (n=200) в динаміці онтогенезу: на 1, 15, 30, 45 та 60-ту добу. Тварини були поділені з використанням принципу рандомізації на 2 підгрупи, кожна з яких містила по 20 щурів-самиць:

- 1) контрольна група щурів-самиць та їх приплоду в динаміці онтогенезу: на 1, 15, 30, 45 та 60-ту добу, які піддавалися короткочасному фіксуванню;
- 2) дослідна група щурів-самиць, яким здійснювали гірудовплив (робили чотириразову приставку по 1 голодній МП, один раз на тиждень): двічі до спарювання (передкоїтальний період) та двічі – після спарювання (після коїтальний період) і досліджували показники імунної системи після вигодовування та відсадки від них їх приплоду, їх приплід за гірудовпливу в динаміці онтогенезу: на 1, 15, 30, 45 та 60-ту добу.

Маніпуляцію приставки МП проводили швидко, шляхом короткочасного фіксування тварини (4-5 хв.) в розробленому нами пристрої [229] на поголену загривову ділянку, після присмоктання повний акт годування тривав 30-35 хв. Після відпадання МП від тіла щура ранку присипали стерильним порошком крейди. Кожен із дослідних щурів після приставки МП перебував в індивідуальній клітці до загоєння ранки.

Стан імунної системи самиць характеризували після вигодовування та відсадки від них їх приплоду. Стан імунної системи приплоду характеризували в динаміці онтогенезу: на 1, 15, 30, 45 та 60-ту добу.

2.2.2 Схеми дослідження імуноотропних ефектів водно-сольового екстракту медичної п'явки *Hirudo verbana* в експерименті на лабораторних щурах

В експеримент взято 40 лабораторних нелінійних білих щурів-самиць та їх приплоду (n=200) в динаміці онтогенезу: на 1, 15, 30, 45 та 60-ту добу. Тварини були поділені з використанням принципу рандомізації на 2 підгрупи, кожна з яких містила по 20 щурів-самиць:

- 1) контрольна група щурів-самиць шляхом короткочасного фіксування тварини (4-5 хв.) внутрішньочеревно один раз на тиждень вводили 0,5 мл фізіологічного розчину за наступною схемою: двічі до спарювання (передкоїтальний період) та двічі – після спарювання (після коїтальний період).

2) дослідна група самиць — щурів, шляхом короткочасного фіксування тварини (4-5 хв.), самицям внутрішньочеревно вводили 4 рази, один раз на тиждень в об'ємі 0,5 мл (концентрація білка 2 мг/мл) з кінцевою концентрацією речовини 5 мкг/г тварини за наступною схемою: двічі до спарювання (перикоїтальний період) та двічі – після спарювання (після коїтальний період) і досліджували показники імунної системи після після вигодовування та відсадки від них їх приплоду, їх приплід за впливу водно-сольового екстракту МП в динаміці онотогенезу: на 1, 15, 30, 45 та 60-ту добу.

2.3 Визначення морфометричних показників тіла та лімфоїдних органів

Для визначення морфометричних показників тіла тварин вимірювали масу, довжину тіла та хвоста, окружність грудної клітки та живота. Масу тварин вимірювали за допомогою аптечних вагів. Розміри тіла вимірювали за допомогою штангенциркуля. Масу лімфоїдних органів вимірювали за допомогою торсійних вагів.

2.4 Підготовка зразків біологічного матеріалу

Отримання зразка крові для дослідження. У лабораторних щурів кров отримували після декапітації та одразу аналізували. Кров експериментальних тварин стабілізували гепарином (20 мкг/мл, «Спофа») [230].

Приготування водно-сольового екстракту з тіл кільчеців. Водно-сольовий екстракт із тіл МП *H. verbana* отримували за розробленим способом [231]. Для отримання водно-сольового екстракту з тіл МП брали 45 МП віком 7-8 місяців, які голодували не менше 3-4 місяців. Тіла *H. verbana* фрагментували ножицями, фрагменти промивали забуференим (рН 7,2) фізрозчином від залишків їжі (крові) в органах системи травлення. Далі частки кільчеців фрагментували в фарфоровій ступці з кварцевим піском. В отриманий

тканинний гомогенат додавали фізіологічний розчин із розрахунку 1:10 і екстрагували БАР в холодильнику при 4°C протягом 12 годин із періодичним струшуванням. Надосад центрифугували в рефрижераторній центрифугі при 1500 об./хв. протягом 30 хв. Далі супернатант стерилізували шляхом пропускання через бактеріальний фільтр із діаметром пор 0,23 мкм (Synpor), ампулювали в мікропробірках «Eppendorf» та зберігали при температурі -20 °C до використання. Концентрацію білка (мкг/мкл) в екстракті визначали за загальноприйнятим методом Лоурі [232-237]. Отримані показники використовували для розрахунку стимулюючої дози речовини, при тестуванні на тваринах *in vivo* та в культурі лейкоцитів *in vitro*.

Отримання кісткового мозку у тварини. Після декапітації швидко вилучали стегнові кістки тварин, очищали їх від прилеглих м'язів за допомогою стерильної марлі. Після отримання кістки тварини обрізали епіфізи і розрізали кістку по горизонтальній довжині здавлюючи кістку пінцетом її вимивали та промивали теплим гіпотонічним 0,9 % цитратом натрію (37 °C), після чого видаляли кістку, а суміш переносили у центрифужні пробірки. використовуючи для цієї мети пастерівську піпетку. Шматочки кісткового мозку подрібнювали піпетуванням [232-237].

Отримання біоматеріалу лімфоїдних органів у тварин. Після декапітації робили розтин тварин, забирали цілі лімфоїдні органи, які швидко піддавали фіксації у 10% формаліні [239, 240].

2.5 Імунологічні методи дослідження

2.5.1 Оцінка лейкоцитарного складу крові

Кількість лейкоцитів аналізували стандартною методикою. Досліджувану стабілізовану антикоагулянтном венозну кров розводили в 20 разів. Для цього в лунку серологічного планшету вносили 0,4 мл 5 % розчину оцтової кислоти, підфарбованого кількома краплями розчину метиленового синього (для

фарбування ядер лейкоцитів), і додавали 0,02 мл досліджуваної крові. Суміш ретельно перемішували піпеткою та залишали на 1-2 хв. до повного лізису еритроцитів, після чого знов ретельно перемішували і 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 [232, 235].

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

Мазки крові для морфологічного дослідження готували за стандартним способом [235], визначення клітин проводили під мікроскопом [8, 240].

Аналіз пофарбованого мазка крові здійснювали під імерсійним об'єктивом (100×) мікроскопа. Лейкоцити диференціювали за відповідними морфологічними ознаками [237, 241], рахували 200 лейкоцитів. Після завершення аналізу 200 лейкоцитів визначали лейкоцитарну формулу — абсолютне та відносне співвідношення різних видів лейкоцитів.

2.5.2 Оцінка проліферативної активності лімфоцитів

Проліферативну активність лімфоцитів оцінювали в цільній крові за реакцією бластної трансформації лімфоцитів (РБТЛ) [8, 233, 234]. 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) у дозі 10 мкг/мл.

Для дослідження впливу МП на проліферативну активність лімфоцитів додавали в проби водно-сольовий екстракт з тіл *H. verbana* Carena, 1820 у дозі 5 мкг/мл. Стимулююча доза водно-сольового екстракту із тіл медичної п'явки була нами обрана за результатами попереднього тестування.

Культивування проводили впродовж 24 год за температури 37°C. 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-Гімзе 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 плазмолемми, вакуолізація ядра і цитоплазми, каріорексис ядра та ін.) та некрозу (оксифільні плями) також відносили до активованих [8].

2.5.3 Визначення фагоцитарної активності нейтрофілів

Фагоцитарну активність нейтрофілів (ФАН) оцінювали в тесті з дріжджами (*Saccharomyces cerevisiae*) за розробленим нами методом [242]. Постановку реакції фагоцитозу проводили таким чином: наносили цільну кров, стабілізовану гепарином в обсязі 200 мкл на білковані 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° С, впродовж 90-95 хв. в умовах струшування, після інкубації предметні скельця 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 [240] 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: фагоцитарний індекс (ФІ) — відсоток нейтрофілів, які беруть участь у фагоцитозі, від їх загальної кількості; фагоцитарне число (ФЧ) — середня кількість мікроорганізмів, поглинутих одним нейтрофілом [8, 235].

2.5.4 Дослідження оксидативного метаболізму нейтрофілів

Оксидативний метаболізм нейтрофілів (ОМН) оцінювали в тесті з додаванням нітросинього тетразолію (НСТ) за стандартним методом та додаванням дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*), як стимулятора фагоцитарної активності нейтрофілів [233, 234].

Постановку реакції ОМН проводили таким чином: у лунку планшета для серологічних досліджень дозатором вносили по 0,05 мл цільної крові, стабілізованої гепарином у дві лунки; в першу додавали 0,05 мл НСТ; в другу 0,05мл НСТ та 0,05 мл 1% суспензії дріжджів; старанно перемішували піпетуванням. Інкубували в термостаті 30 хв. за температури 37°C, із періодичним струшуванням кожні 10 хв., після чого готували мазки; фіксували та фарбували їх 1% розчином сафраніну 20 хв. [234].

Підраховували 200 нейтрофілів за допомогою мікроскопу з використанням імерсійного об'єктиву (об'єктив 100×, окуляр К7×).

Визначали кількість клітин, що містять гранули синього кольору та вираховували їх відсоток від загальної кількості клітин [234].

2.6 Оцінка показників гемограми

Кількість еритроцитів визначали стандартною методикою. В суху чисту пробірку вносили 4 мл розчину хлориду натрію, куди вносили 0,02 мл цільної крові щура. Вміст пробірки старанно зміщували. Одну краплю приготованої суспензії вносили в щілину камери, 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 $20\times$). 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 ($\times 10^{12}/\text{л}$) [233, 234].

Гемоглобін визначали 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 [232, 234].

2.7 Оцінка проліферативної активності кісткового мозку тварини

Проліферативну активність кісткового мозку оцінювали за мітотичним індексом. 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, залишаючи на добу у холодильнику. Після цього готували цитологічні препарати, висушували їх та фарбували упродовж 40 хв. за Романовським-Гімзе.

Аналізували 3000 клітин, визначали ті, що знаходяться у мітозі. Мітотичний індекс виражали в проміле — кількості мітозів на 3000 клітин [232, 234].

2.8 Гістологічні дослідження

Мікроморфометричне дослідження лімфоїдних органів (селезінки та тимусу) проводили у самиць — шурів та їх приплоду в динаміці онтогенезу: на 1, 15, 30, 45 та 60-ту добу за впливу водно-сольового екстракту та слини МП. 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 [238, 239].

Аналізували гістологічні особливості білої пульпи селезінки – площу та діаметр лімфоїдних фолікулів та центральних артерій і кількість лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм^2), у тимусі - кількість лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм^2) в кірковій та мозковій речовині.

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 2011.

2.9 Статистична обробка отриманих результатів

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням параметричних статистичних методів (t-критерій Ст'юдента), попередньо перевірявши 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 «Excel» та IBM SPSS Statistics 21,0 (USA). Відмінності вважали достовірними при рівні значимості $p < 0,05$ (Лакин, 1990; Dunn, Clark, 2009). Виявлення зв'язку між показниками оцінювали за результатами кореляційного аналізу; коефіцієнт кореляції Пірсона (r) використовували для оцінки зв'язку між кількісними показниками. [8, 243, 244].

РОЗДІЛ 3

ВПЛИВ СЛИНИ МЕДИЧНОЇ П'ЯВКИ, ЗАСТОСОВАНОЇ САМИЦЯМ ЩУРІВ У ПЕРЕД- ТА ПІСЛЯ КОЇТАЛЬНОМУ ПЕРІОДАХ, НА ЇХ ІМУННУ РЕАКТИВНІСТЬ ТА ІМУННИЙ СТАТУС ПРИПЛОДУ В ДИНАМІЦІ ПОСТЕМБРІОНАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗУ.

Експериментальні дослідження цього розділу присвячені вивченню гірудологічного впливу медичної п'явки виду *Hirudo verbana* у передкоїтальному та після коїтальному періодах на кількісні та функціональні показники лейкоцитів периферичної крові, проліферативну активність кісткового мозку, фізичні параметри тіла, морфометричні, морфологічні та цитологічні показники лімфоїдних органів імунної системи самиць щурів та їх приплоду в динаміці постембріонального онтогенезу: на 1, 15, 30, 45 та 60-ту добу.

При всіх експериментально-клінічних дослідженнях стану організму обов'язково в першу чергу досліджують гематологічні та лейкоцитарні показники крові, які відображають гомеостатичний стан організму на момент обстеження. Масові та лінійні показники тіла теж відображають фізіологічні особливості розвитку досліджуваного [245, 246]. Дослідження кількісних та функціональних показників крові в комплексі з обстеженням фізичних параметрів тіла тварини дозволяє виявити приховані зміни в органах і тканинах, визначити ускладнення, диференціювати захворювання, оцінити функціональний стан окремих органів і систем, контролювати ефективність лікувальних і профілактичних заходів, прогнозувати результат захворювання. Кров, як одна із біологічних рідин організму відповідає якісними і кількісними змінами свого складу на будь-які екзогенні та ендогенні впливи, а тому є своєрідним біомаркером, який дозволяє визначити загальний стан органів і систем та оцінити перебіг основних обмінних процесів. Саме тому дослідження кількісних та функціональних показників крові, в комплексі з обстеженням фізичних параметрів тіла тварини дозволяє встановити перехід фізіологічного

стану організму в патологічний, зокрема і за дії на нього екзогенних факторів [247].

3.1. Гематологічні показники, морфометричні характеристики тіла та лімфоїдних органів приплоду в постембріональному онтогенезі за гірудовпливу статевозрілих самиць щурів у передкоїтальному та після коїтальному періодах

У дослідних самиць щурів, які були виведені з експерименту після вигодовування та відсадки від них їх приплоду, у більшості термінах збільшувалися всі фізичні параметри тіла (табл. 3.1), але найбільша амплітуда приросту відзначалася для показників маси тіла (табл. 3.1), що мабуть могло відбутися зарахунок підвищення маси лімфоїдних органів. Також, слід відмітити, що самиці в середньому народжували більшу кількість приплоду (9-12 щурят), вони були більш активніші, в порівнянні з контрольною групою (6-7°щурят).

Таблиця 3.1

Фізичні параметри тіла самиць щурів та їх приплоду в постембріональному онтогенезі після гірудовпливу

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

Застосування гірудовпливу у передкоїтальному та після коїтальному періодах самицям, було асоційоване зі збільшенням маси їх приплоду в динаміці постнатального онтогенезу. Найбільшою мірою маса приплоду у тварин, що зазнали ГВ, відрізнялася від такої у контрольних тварин у підсисному періоді, тобто на 15-ту добу (15,2%) та в період початку (на 30-ту добу – 24,2%), а також кінця статевого дозрівання (на 60 добу–13,8%).

Отримані дані можуть вказувати про позитивний ефект ГВ на ефективність грудного вигодовування та формування гормональних систем приплоду.

При аналізі лімфоїдних органів (тимусу та селезінки) самиць щурів, котрі зазнали ГВ у перикоїтальному періоді, зареєстровано збільшення показників маси тимусу на 34,5% та селезінки - 19,8% ($p < 0,05$) (табл. 3.2).

Позитивні зміни морфометричних параметрів лімфоїдних органів при імуностимуляції порівняно з контрольною групою тварин зареєстровано і іншими авторами [248-250].

У приплоду різного періоду онтогенезу зареєстроване збільшення усіх морфометричних показників лімфоїдних органів (табл.3.2). Максимальне збільшення реєструється при аналізі їх маси. При аналізі тимусу: на 15 добу – 28,12%, на 30 добу – 49,83%, на 45 добу 16,87%. Аналізуючи показники маси селезінки: на 15 добу – 50,39%, на 30 добу – 49,78%, на 45 добу – 54, 81% ($p < 0,05$) (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Морфометричні показники лімфоїдних органів самиць щурів та їх приплоду в постембріональному онтогенезі після гірудовпливу

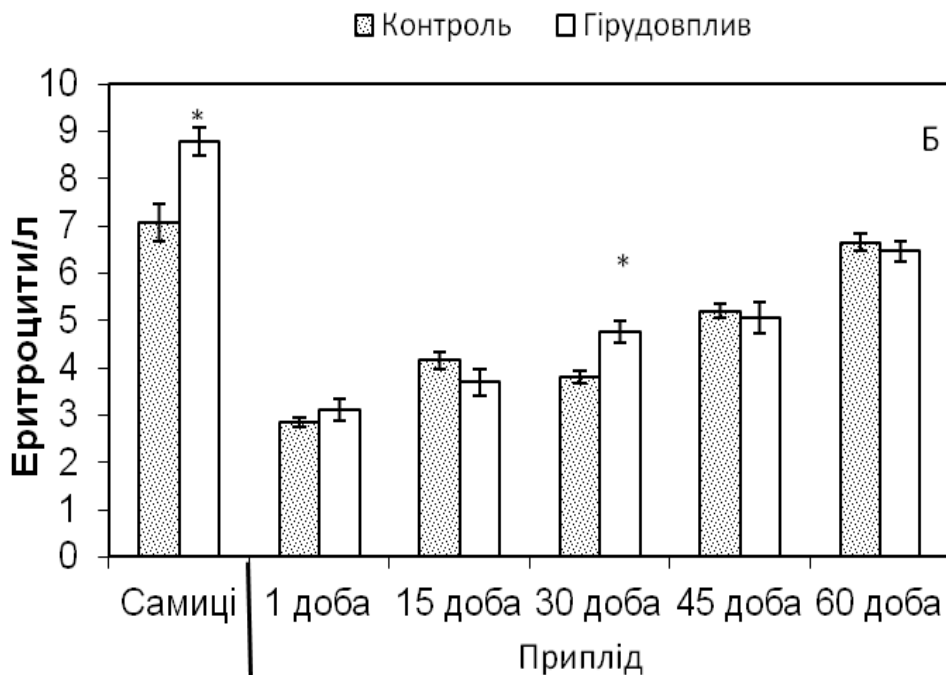
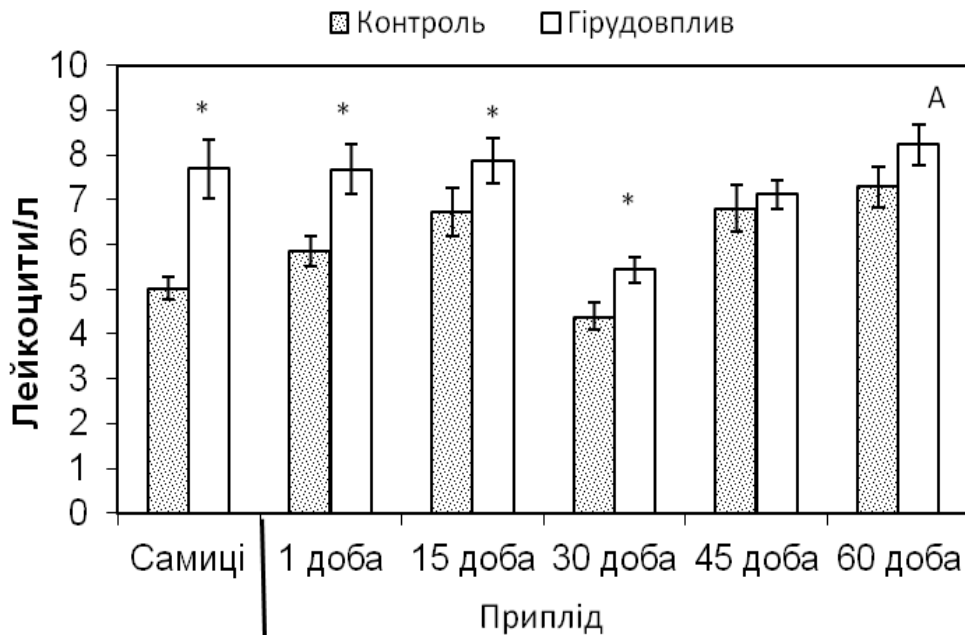
Показники лімфоїдних органів ($X \pm SE$)							
Група тварин		Тимус			Селезінка		
		Маса (мг)	Довжина (см)	Ширина (см)	Маса (мг)	Довжина (см)	Ширина (см)
1	2	3	4	5	6	7	8
Самиці	Контроль, n=20	169,65±9,9	0,92±0,09	0,92±0,08	579,42±25,33	3,44±0,20	0,80±0,04
	Гірудовплив, n=20	228,15±15,54*	1,10±0,10	1,11±0,10*	694,20±27,43*	3,59±0,21	0,91±0,05*
Приплід							
1 доба	Контроль, n=20	9,41±0,96	0,22±0,04	0,20±0,04	15,25±0,80	0,83±0,05	0,19±0,04
	Гірудовплив, n=20	15,32±1,24*	0,34±0,05*	0,29±0,04*	21,25±2,63*	1,05±0,09*	0,25±0,05
15 доба	Контроль, n=20	70,75±6,89	0,77±0,07	0,71±0,07	56,52±4,69	1,37±0,10	0,39±0,04
	Гірудовплив, n=20	90,65±6,81*	0,87±0,04*	0,73±0,08	85,00±5,34*	1,69±0,13*	0,44±0,05*
30 доба	Контроль, n=20	110,00±5,32	1,00±0,10	0,90±0,08	116,2±5,81	1,90±0,16	0,49±0,05
	Гірудовплив, n=20	164,81±9,76*	1,18±0,10	1,21±0,12*	174,05±8,89*	2,24±0,22*	0,61±0,04*

Продовження таблиці 3.2

1	2	3	4	5	6	7	8
45 доба	Контроль, n=20	272,85±13,7	1,31±0,11	1,40±0,13	427,80±45,14	2,79±0,24	0,68±0,03
	Гірудовплив, n=20	335,70±15,97*	1,51±0,12*	1,60±0,13*	662,30±30,44*	3,40±0,33*	0,96±0,06*
60 доба	Контроль, n=20	396,97±17,43	1,53±0,12	1,58±0,11	524,10±23,87	3,04±0,31	0,75±0,05
	Гірудовплив, n=20	404,80±18,43	1,73±0,14*	1,80±0,16*	753,50±43,75*	3,62±0,29*	0,96±0,07*

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

Застосування ГВ самицям щурів у передкоїтальний та після коїтальний періодах, спричиняло зміни кількісних показників лейкоцитів периферичної крові, еритроцитів та вмісту гемоглобіну (рис.3.1, А, Б, В). Кількість лейкоцитів у крові самиць, котрі зазнали ГВ, була збільшена на 54%, кількість еритроцитів - на 24%, вміст гемоглобіну - на 16% ($p < 0,05$). У той час, як лейкоцитарна формула крові залишалася в межах фізіологічних норм (табл. 3.3).



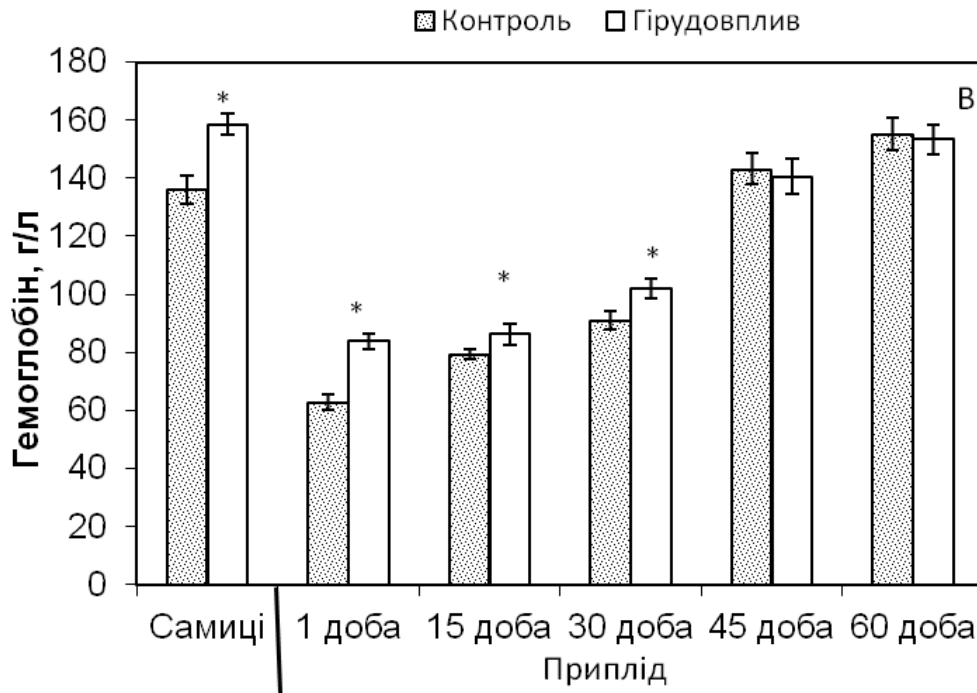


Рисунок 3.1. Гематологічні показники самиць щурів та їх приплоду в постембріональному онтогенезі після гірудовпливу. А – абсолютна кількість лейкоцитів, Б – абсолютна кількість еритроцитів, В – вміст гемоглобіну; $n = 20$ для кожної підгрупи тварин.

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

У приплоду різного періоду онтогенезу контрольної групи досліджені показники гемограми знаходилися в референтних межах для даного віку [187,°188, 236]. У потомства самиць, котрі зазнали ГВ, зареєстровано збільшення абсолютної кількості циркулюючих лейкоцитів на ранніх етапах постнатального онтогенезу, а також збільшення вмісту гемоглобіну, статистично вірогідне лише до досягнення тваринами пубертатного періоду.

Таблиця 3.3

Лейкоцитарна формула крові самиць щурів та їх приплоду в постембріональному онтогенезі після гірудовпливу

Група тварин		Лейкоцити/л ($\times 10^9$)	Лейкоцитарна формула крові,% ($X \pm SE$)						
			Нейтрофіли			Лімфоцити	Моноцити		
			Еозинофіли	Паличко- ядерні	Сегменто- ядерні			Загальний відсоток	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Самиці	Контроль, n=20	5,02 \pm 0,98	-	12,01 \pm 2,71	14,40 \pm 3,5	26,41 \pm 4,15	70,16 \pm 4,57	3,40 \pm 2,62	
	Гірудовплив,n=20	7,7 \pm 0,66*	0,46 \pm 0,06*	12,61 \pm 3,32	13,90 \pm 3,46	26,51 \pm 4,41	70,31 \pm 4,46	2,26 \pm 1,49	
Приплід									
1 доба	Контроль, n=20	5,85 \pm 0,35	-	8,68 \pm 2,81	43,29 \pm 4,95	51,97 \pm 5,00	46,76 \pm 4,99	1,25 \pm 1,11	
	Гірудовплив,n=20	7,68 \pm 0,17*	0,17 \pm 0,02*	9,92 \pm 2,99	41,95 \pm 4,93	51,87 \pm 5,00	46,8 \pm 4,99	1,18 \pm 1,08	
15 доба	Контроль, n=20	6,74 \pm 0,54	-	4,95 \pm 2,17	16,62 \pm 3,72	21,57 \pm 4,11	76,9 \pm 4,03	1,51 \pm 1,20	
	Гірудовплив,n=20	7,87 \pm 0,41*	-	5,87 \pm 2,35	14,22 \pm 3,49	20,09 \pm 4,00	79,58 \pm 4,03	0,62 \pm 0,05	
30 доба	Контроль, n=20	3,39 \pm 0,06	0,63 \pm 0,05*	5,10 \pm 2,2	11,90 \pm 3,24	17,00 \pm 3,76	81,87 \pm 3,85	0,47 \pm 0,06*	
	Гірудовплив,n=20	5,43 \pm 0,19*	0,09 \pm 0,01	4,66 \pm 2,11	15,97 \pm 3,66	20,63 \pm 4,05	78,93 \pm 4,08	0,10 \pm 0,01	
45 доба	Контроль, n=20	6,81 \pm 0,51	0,01 \pm 0,005	2,69 \pm 1,62	10,32 \pm 3,04	13,01 \pm 3,30	85,86 \pm 3,48	1,24 \pm 1,10	
	Гірудовплив,n=20	7,12 \pm 0,31	0,17 \pm 0,02*	6,43 \pm 2,45	11,53 \pm 3,06	17,96 \pm 3,75	81,40 \pm 3,81	0,17 \pm 0,02	

Продовження таблиці 3.3

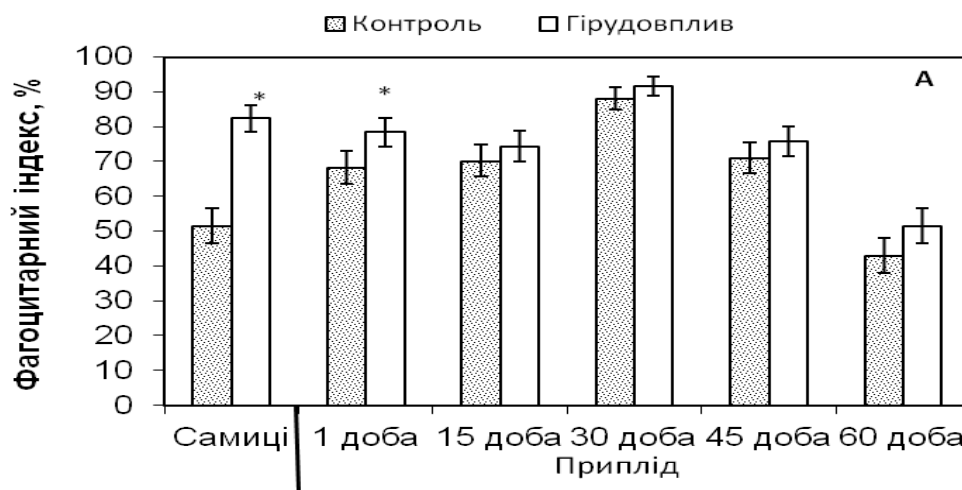
1	2	3	4	5	6	7	8	9
60 доба	Контроль, n=20	7,29±0,09	3,64±1,87	8,20±2,75	11,84±3,24	86,68±3,5	1,47±1,10	-
	Гірудовплив, n=20	8,23±0,45*	3,70±1,89	12,48±3,30	16,18±3,56	82,9±3,76	1,04±1,10	-

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

Слід відмітити, що, незважаючи на вірогідне збільшення кількісного показника циркулюючих лейкоцитів у приплоду тварин, котрі зазнали ГВ в передембріональний та ембріональний періодах розвитку, відсутнє відхилення від фізіологічної норми у 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, відіграють еозинофіли.

3.2 Поглинальна активність та оксидативний метаболізм нейтрофілів крові самиць та їх приплоду в постембріональному онтогенезі

Збільшення частки активованих до фагоцитозу циркулюючих нейтрофілів – ознака їх прозапальної активності. При аналізі цього показника у самиць щурів, що зазнали ГВ у передкоїтальному та після коїтальному періодах, було зареєстровано достовірне збільшення його числових значень. Аналогічно виявлено і у приплоду цих тварин у ранній постнатальний період, ФІ досягав статистичного значущого рівня у самиць (на 37,49%) та у їх приплоду на 1 добу (на 12,89%) дослідження, а ФЧ на 45 (на 16,37%) та 60-ту (на 22,42%) добу (рис. 3.2, А, Б). Такі зміни показників фагоцитарної активності нейтрофілів пов'язані з активацією вродженого імунітету під впливом МП, і відповідають даним інших авторів [1, 12, 14].



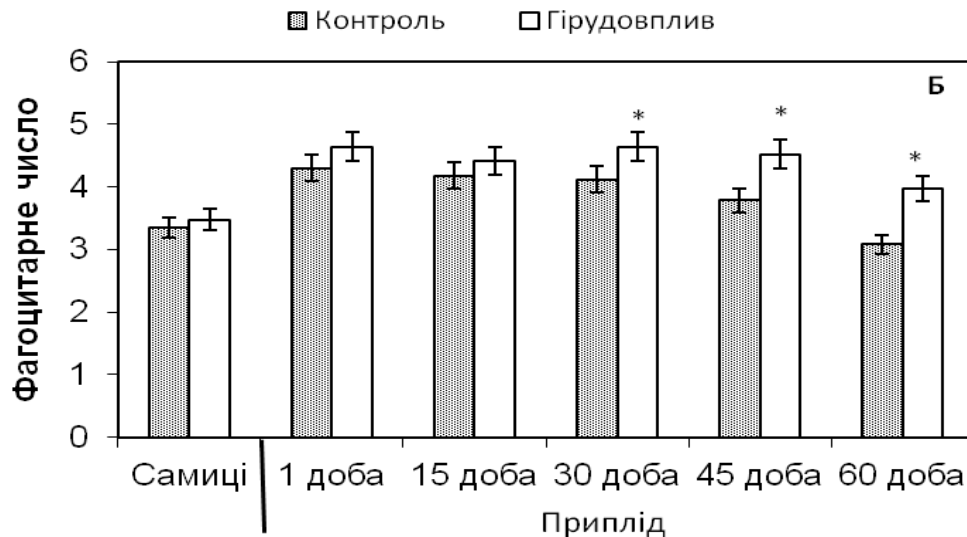
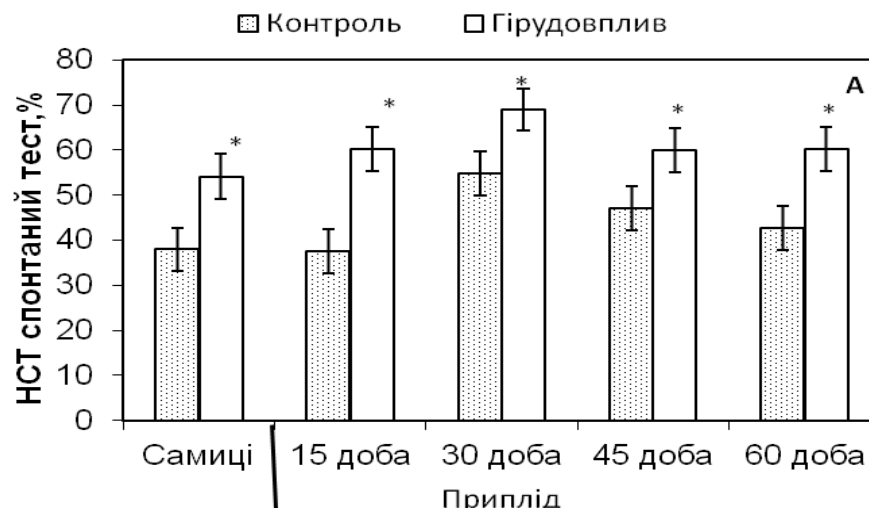


Рисунок 3.2. Фагоцитарна активність нейтрофілів крові самиць щурів та їх приплоду в постембріональному онтогенезі після гірудовпливу. А – фагоцитарний індекс, Б – фагоцитарне число; $n = 20$ для кожної підгрупи тварин.

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

Результати дослідження ОМН у самиць, які зазнали ГВ, та їх приплоду показали, що показники спонтанного НСТ-тесту були вірогідно більшими у самиць (на 29,80%) та її приплоду на всіх термінах дослідження порівняно з контролем: на 15 (на 37,84%), 30 (на 20,64%), 45 (на 21,42%) та 60-ту (на 29,14%) добу, таке ж збільшення зареєстроване при аналізі показників стимульованого НСТ-тесту: у дослідних самиць виявлено його збільшення (на 20,49%) та у їх приплоду на 15 добу (на 33,73%) онтогенезу (рис. 3.3, А, Б).



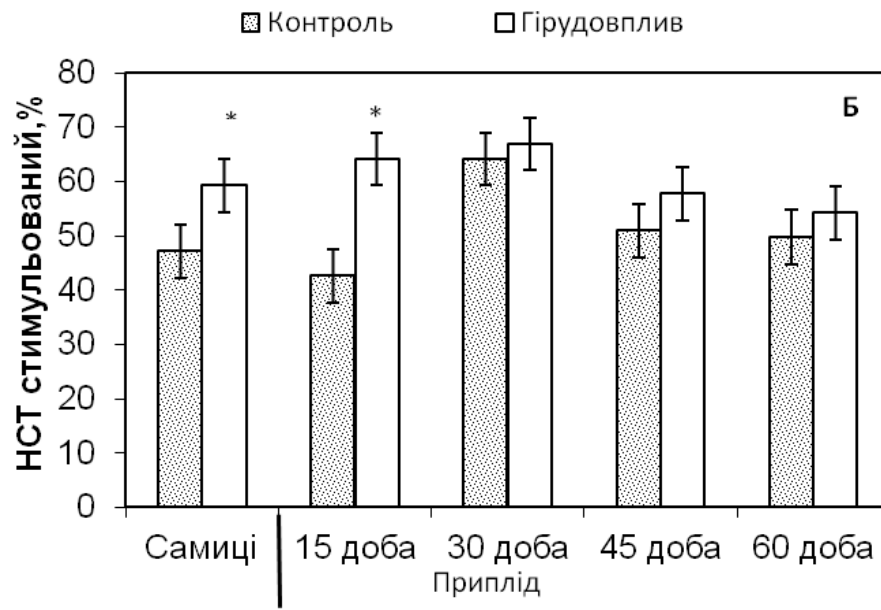


Рисунок 3.3. Оксидативний метаболізм нейтрофілів крові самиць щурів та їх приплоду в постембріональному онтогенезі після гірудовпливу. А – НСТ спонтаний, Б – НСТ стимульований; $n = 20$ для кожної підгрупи тварин.

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

Отримані дані свідчать про позитивний вплив МП на оксидативний метаболізм поліморфноядерних фагоцитів та метаболічний резерв цієї їх функції. Слід зазначити, що стимуляторний ефект на оксидативний метаболізм нейтрофілів спостерігався у потомства навіть у віддалені терміни після проведення ГВ у самиць.

3.3 Проліферативна активність лімфоцитів крові самиць та їх приплоду в постембріональному онтогенезі

Про функціональну активність Т- і В-лімфоцитів судять по РБТЛ з використанням мітогенів. Стимульована бластна трансформація лімфоцитів з рослинним мітогеном КонА, характеризує функціональну здатність Т-лімфоцитів до трансформації та розмноження під впливом алергенів, антигенів та мітогенів. Тим самим, РБТЛ дає змогу своєчасно виявити порушення адаптивної ланки імунітету та діагностувати захворювання.

Підвищена спонтанна проліферація лімфоцитів (бласттрансформація) може бути у обстеженого, який переніс багатократні переливання крові, хворіє алергічними та аутоімунними захворюваннями, при бактеріальних та вірусних інфекціях, а також у новонароджених. Зниження проліферативної відповіді на мітоген КонА свідчить про наявність імунодефіциту. Низька відповідь в РБТЛ може корелювати з дефіцитом Т-клітин в периферичній крові або із 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 озумовлена порушенням продукції таких лімфокінів як ІЛ-1 і ІЛ-2 [251-253].

У статевозрілих самиць щурів зареєстроване значне збільшення відсотку бласттрансформованих лімфоцитів при стимуляції рослинним мітогеном та водно-сольовим екстрактом медичної п'явки (рис. 3.4) порівняно зі спонтанними культурами у дослідних та контрольних групах тварин ($p < 0,05$). Так, у контрольній групі на стимуляцію КонА спостерігали зростання бласттрансформованих лімфоцитів, яке становило 65,20 % відносно спонтанній культурі, при стимуляції екстрактом тканин МП - 75,13%, а у дослідній групі при стимуляції КонА зростання бласттрансформованих лімфоцитів на 51,87 %, при стимуляції екстрактом тканин МП на 65,32% відносно спонтанним. При дослідженні приплоду у контрольних групах значне підвищення на стимуляцію КонА ($p < 0,05$), а при стимуляції екстрактом тканин МП, культура статистично не відрізнялась від спонтанних культур. При порівнянні груп між собою, у дослідної групи, у всіх культурах крові статевозрілих самиць та їх приплоду на всіх етапах розвитку, значне збільшення бластнотрансформованих лімфоцитів, порівняно з контрольною групою тварин ($p < 0,05$). У досліді РБТЛ на стимуляцію екстрактом тканин МП наближалися до показників, як на рослинному лектині КонА. РБТЛ морфологічно відрізнялася. Бласти, стимульовані рослинним лектином, були типові за морфологією. При

стимуляції екстрактом тканин МП бласти мали недостатньо розвинену цитоплазму та знижену її базофільність, як результат недостатнього розвитку білок-синтетичної системи. У культурах, в які додавали БАР МП стимульовані лімфоцити мали признаки апоптозу. В таких культурах також зустрічались некротичні лімфоцити у вигляді дифузних оксифільних плям. Апоптоз та некроз лімфоцитів може свідчити про протизапальну дію п'явки.

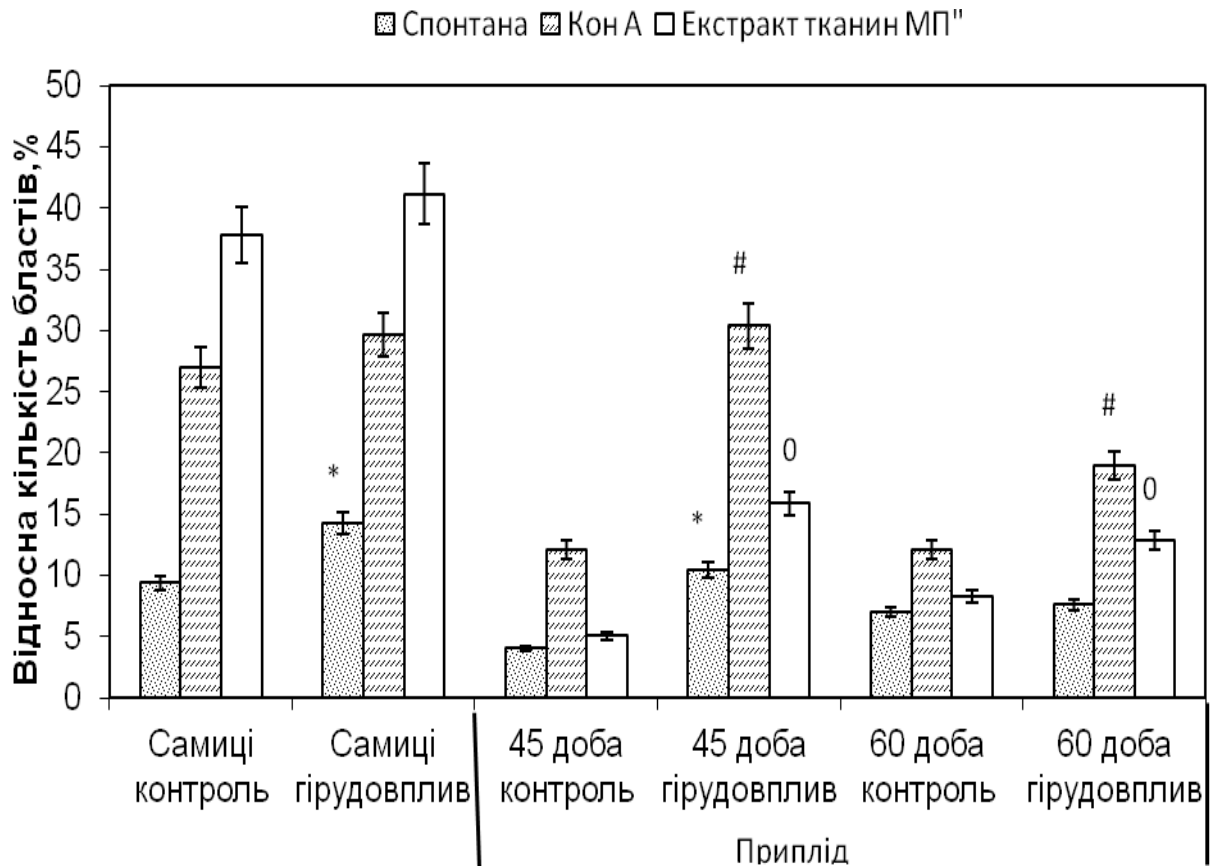


Рисунок 3.4. Проліферативна активність лімфоцитів крові самиць щурів та їх приплоду в постембріональному онтогенезі після гірудовпливу. Спонтана – без додавання стимуляторів, Кон А – культура з додаванням рослинного мітогену, екстракт тканин МП – культура з додаванням водно-сольового екстракту *Hirudo verbana*; n = 20 для кожної підгрупи тварин.

Примітка: * - $p < 0,05$ порівняно із спонтанними культурами контрольної групи, # - $p < 0,05$ порівняно із Кон А культурами контрольної групи, 0 - $p < 0,05$ порівняно із екстракт тканин МП контрольної групи.

3.4 Мітотичний індекс кісткового мозку самиць щурів та їх приплоду в постембріональному онтогенезі

Для характеристики активності гемопоєзу визначають проліферативну активність кісткового мозку. У кістковому мозку серед різних стадій клітин диференціації знаходяться зазвичай проліферуючі клітини. Чим молодші елементи еритропоєзу і лейкопоєзу, тим вище їх мітотичний індекс. Величина мітотичного індексу характеризує функціональну активність кісткового мозку. Збільшення або зменшення мітотичного індексу, свідчить про порушення морфофункціонального стану первинного органу імунної системи (кісткового мозку).

При дослідженні проліферативної активності клітин кісткового мозку відмічено збільшення мітотичного індексу у самиць щурів та їх приплоду на всіх термінах досліду (рис.3.5).

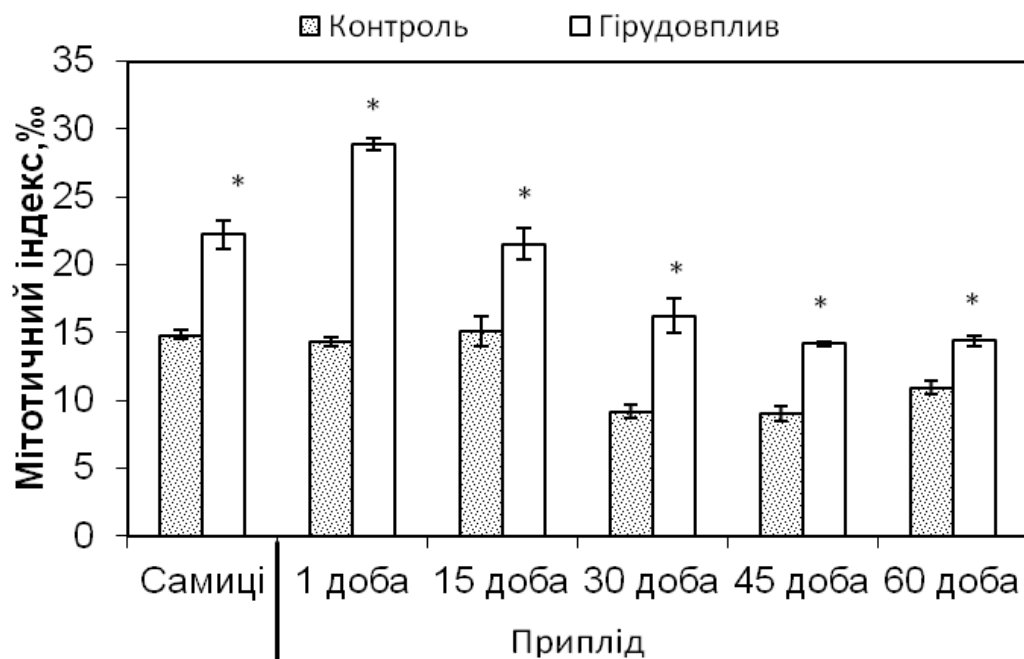


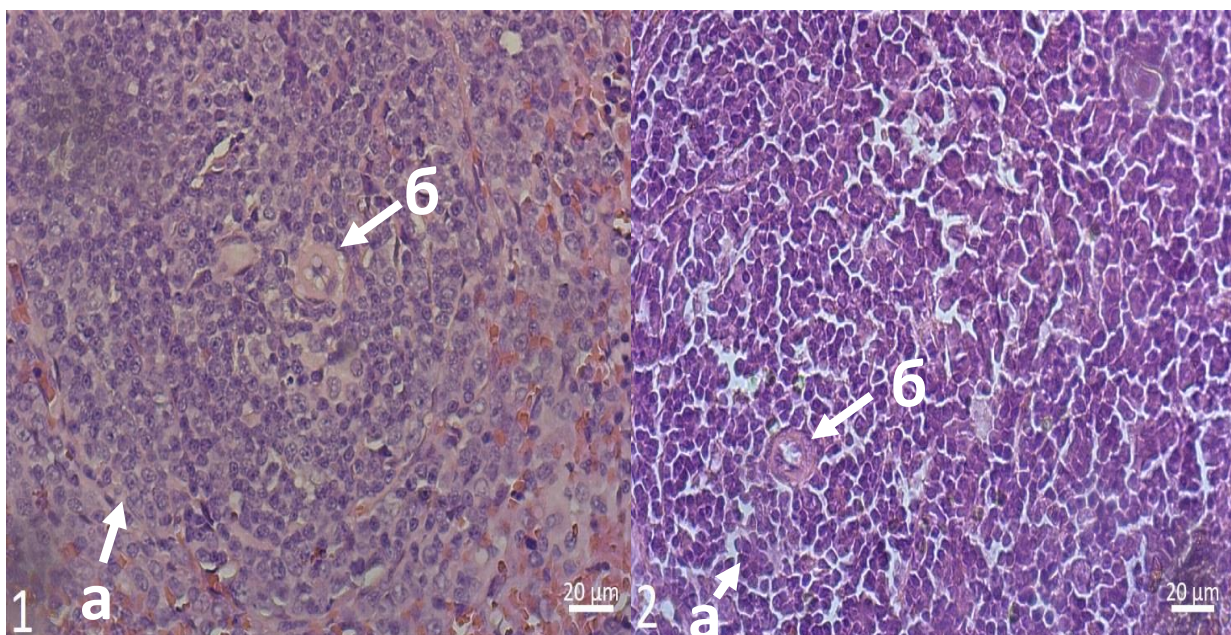
Рисунок 3.5. Проліферативна активність кісткового мозку самиць щурів та їх приплоду в постембріональному онтогенезі після гірудовпливу. $n = 20$ для кожної підгрупи тварин.

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

У дослідної групи самиць мітотичний індекс був підвищений на 32,6% порівняно з контрольною групою тварин. У їх приплоду максимальне підвищення мітотичного індексу зареєстровано на першу добу - 50,9%, порівняно з контрольною групою тварин. Достовірне підвищення проліферативної активності клітин кісткового мозку спостерігали і у інші терміни спостереження: на 15-ту добу (на 29,1%) та 45-ту добу (на 32,2%) ($p < 0,05$), тенденція до збільшення на 30-ту добу (на 42,0%) та на 60-ту добу (на 25,2%) порівняно з контрольною групою тварин.

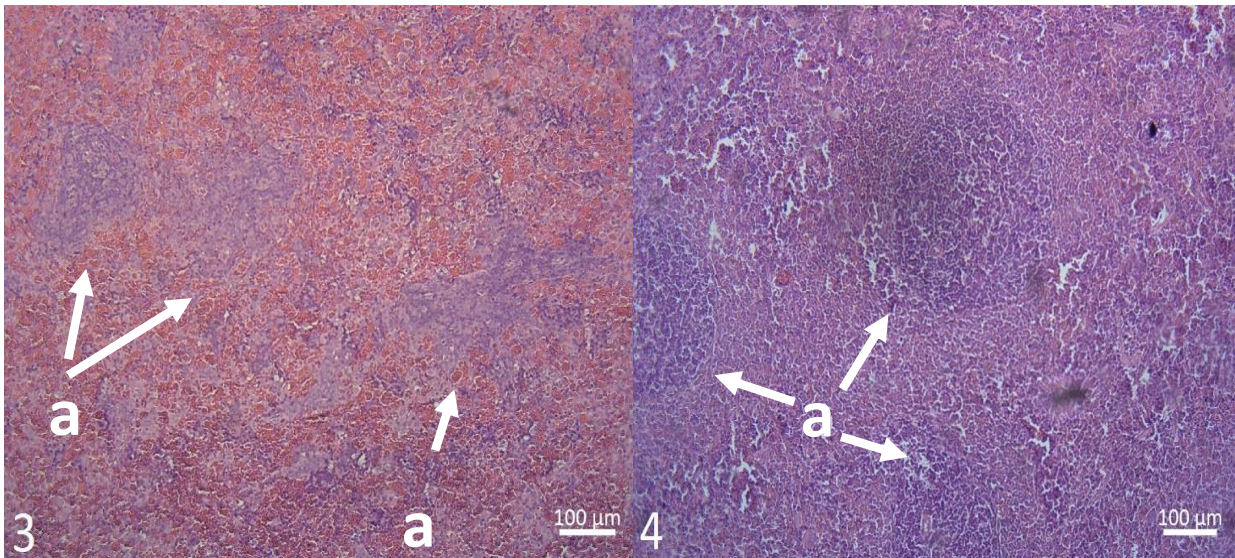
3.5 Цитоморфологічні показники селезінки та тимусу статевозрілих самиць щурів та їх приплоду в постембрональному онтогенезі. Кореляція між показниками маси тіла та лімфодних органів статевозрілих самиць щурів та їх приплоду в постембрональному онтогенезі

При аналізі білої пульпи селезінки у самиць щурів відносно контрольної групи тварин збільшується площа (на 23,22 %) та кількість лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм^2) (на 18,86%) лімфодного фолікула, збільшується площа (на 16,41%), діаметр (на 8,66%) та товщина (на 34,54%) центральних артерій (табл.3.4, рис. 3.6).



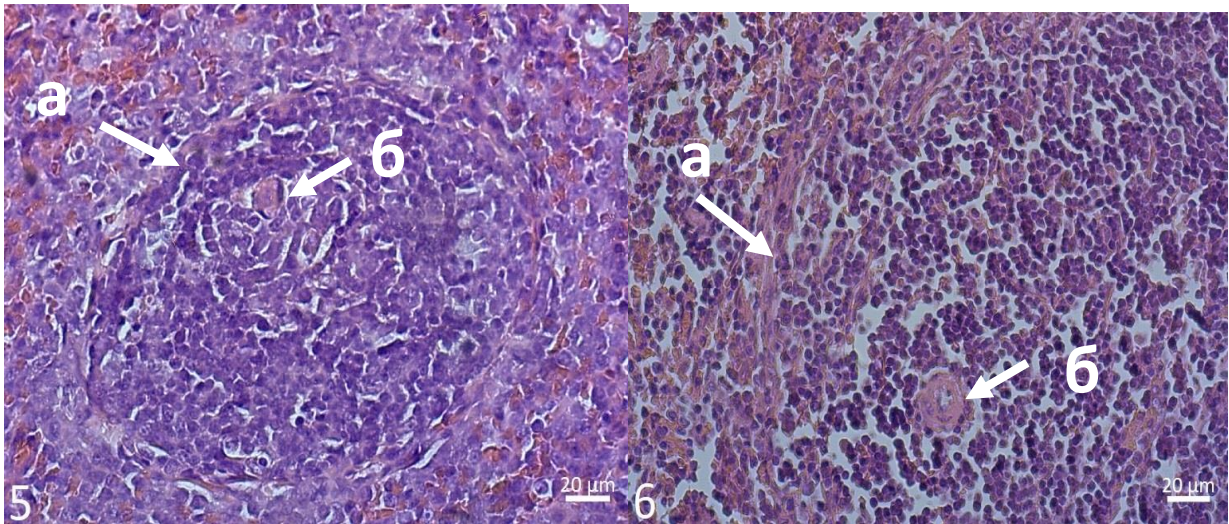
1 – Контроль 45 доба ЛФ

2 – Гірудовплив 45 доба ЛФ



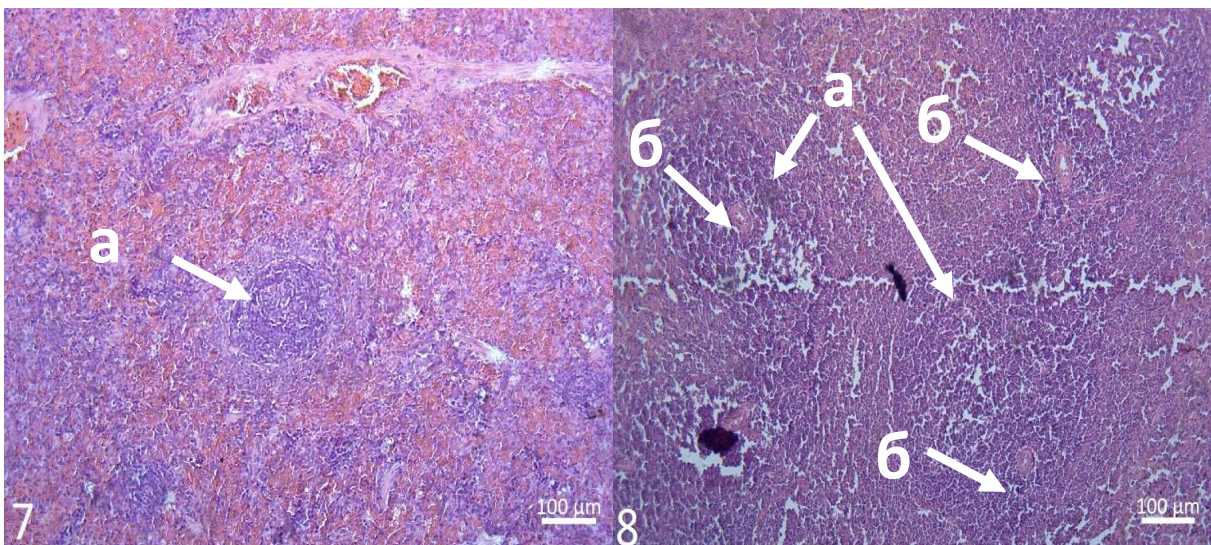
3 – Контроль 45 доба селезінка

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

Рисунок 3.6. Гістологічний препарат селезінки приплоду самиць щурів,

котрі зазнали впливу *Hirudo verbana* у перед- та посткоїтальному періодах (1, 2, 5, 6 збільшення – х 600, 3, 4, 7, 8 – х100). Примітка: а – лімфоїдний фолікул, б – артерія, ЛФ- лімфоїдний фолікул; n = 20 для кожної підгрупи тварин.

Таку ж тенденцію до збільшення показників лімфоїдного фолікула відмічено при аналізі їх приплоду: на 15 добу - площа (на 42,19%), діаметр (на 30,50%) ЛФ та кількість лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм²) (на 35,77%); на 30 - площа (на 19,44%), діаметр (на 15,31%) ЛФ та кількість лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм²) (на 48,25%); на 45 - площа (на 37,26%) та кількість лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм²) (на 32,47%); на 60-ту – площа (на 50,52%), діаметр (на 12,54%) та кількість лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм²) (на 41,25%).

При дослідженні центральних артерій у лімфоїдному фолікулі тенденція до збільшення їх площі, довжини та товщини відмічали у самок та її приплоду на 15 та 60-ту добу.

При аналізі тимусу обох груп самок щурів, зареєстрована його інволюція, а у тимусі приплоду, як в кірковій речовині, так і мозковій, збільшується кількість клітин на одиницю площі, переважання кіркової речовини тимусу над мозковою, що свідчить про стимулюючий вплив слини *Hirudo verbana* на лімфоїдні органи (селезінку та тимус) імунної системи досліджуваних щурів.

Досліджуючи кіркову речовину тимусу приплоду щурів, відмічено збільшення кількості клітин на одиницю площі (400 мкм²) на 15 добу (17,00%), 30 добу (30,42%), 45 добу (20,35%) та 60-ту добу (36,72%) (рис. 3.7).

При дослідженні мозкової речовини збільшується кількість клітин на одиницю площі (400 мкм²) на 15 (6,64%), 30 (3,59%) та 45-ту (5,45%) добу (рис.° 3.7).

Таблиця 3.4

Морфологічні показники білої пульпи селезінки самиць та їх приплоду в постембріональному онтогенезі

Група тварин		Лімфоїдний фолікул				Центральна артерія		
		Площа, мкм ²	Діаметр мкм	Кількість лімфоцитів на 400 мкм ² ЛФ	Кількість макрофагів на 400 мкм ² ЛФ	Площа, мкм ²	Діаметр мкм	Товщина мкм
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Самиці	Контроль, n=20	15302,3±1353,9	137,8±15,8	16,1±0,5	–	831,5±65,9	27,1±1,2	9,4±0,6
	Гірудовплив, n=20	19931,1±1021,6*	117,0±14,4	19,8±0,6*	–	994,7±30,4*	29,7±1,9	14,4±2,8*
Приплід								
1 доба	Контроль, n=20	5550,4±785,1	75,8±0,8	7,7±0,7	–	373,5±9,3	21,4±2,6	5,5±2,0
	Гірудовплив, n=20	5493,6±748,4	77,9±1,7	13,0±0,2*	–	381,1±5,0	21,2±0,3	6,7±0,6
15 доба	Контроль, n=20	18936,1±2033,8	154,8±14,1	11,0±0,3	0,02±0,05	819,6±170,8	29,8±3,2	10,2±1,6
	Гірудовплив, n=20	32758,2±3010,7*	222,8±13,2*	17,1±0,4*	0,21±0,05	1656,9±334,6*	48,2±8,4*	16,0±2,5*
30 доба	Контроль, n=20	23293,0±1943,4	167,0±11,9	8,4±0,3	0,20±0,03	479,5±83,9	23,0±2,2	7,7±0,3
	Гірудовплив, n=20	28914,1±1731,3*	197,2±15,4*	16,2±0,2*	0,19±0,09	465,1±295,4	22,9±8,0	9,9±1,1*

Продовження таблиці 3.4

1	2	3	4	5	6	7	8	9
45 доба	Контроль, n=20	52347,0±7780,7	275,3±37,6	12,3±0,3	–	1314,2±484,5	37,0±6,2	11,6±1,1
	Гірудовплив, n=20	83436,4±1152,0*	272,2±85,0	18,2±1,0*	–	957,4±313,9	33,2±6	10,5±2,1
60 доба	Контроль, n=20	35263,2±3292,0	238,2±12,3	11,3±0,8	0,58±0,13	818,0±286,6	30,6±5,0	5,65±0,87
	Гірудовплив, n=20	71264,0±2395,5*	272,3±11,8*	19,3±1,1*	0,56±1,8	1955,5±409,8*	50,1±7,3*	19,9±3,3*

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

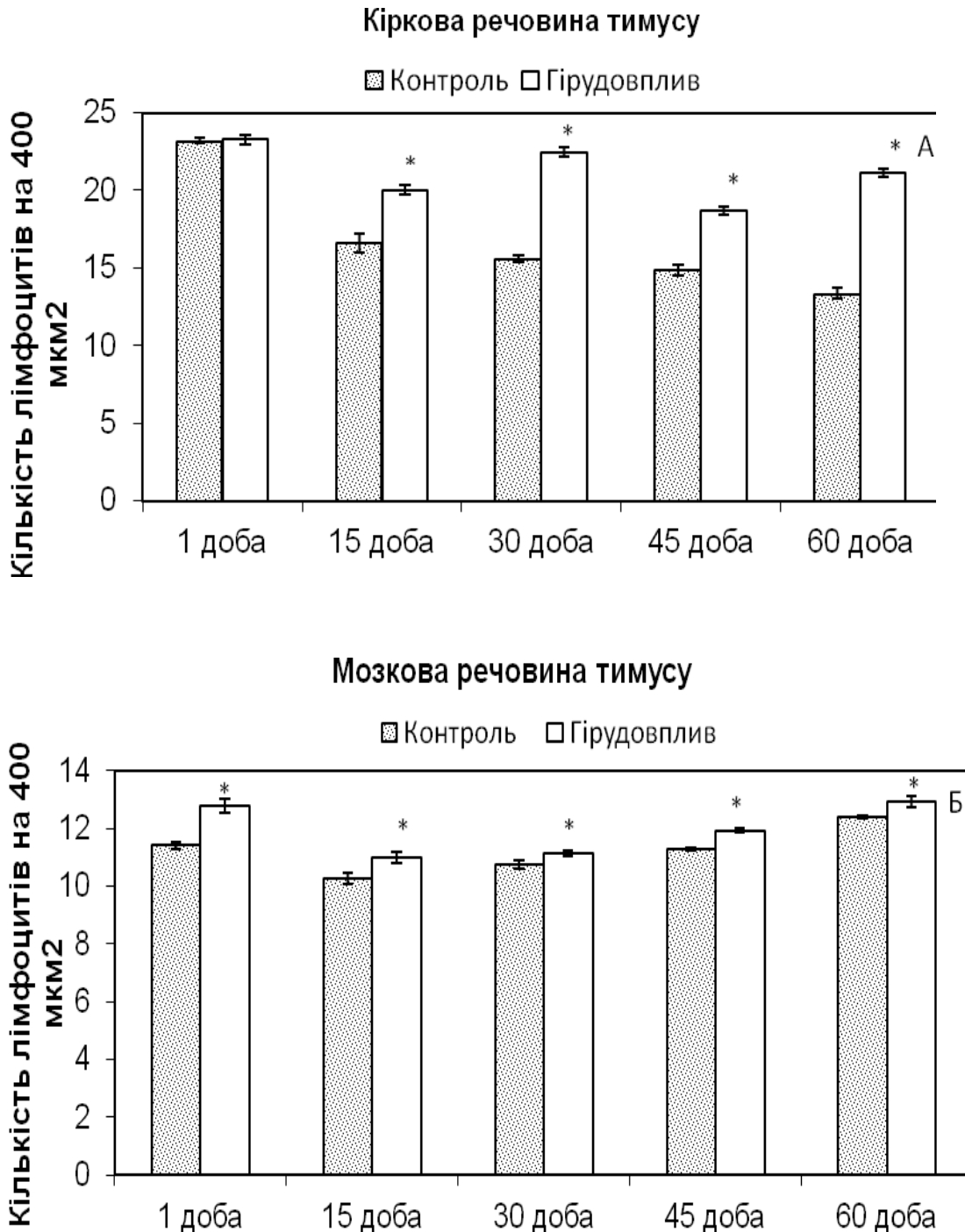


Рисунок 3.7. Кількість лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм²) речовин тимусу приплоду в постембріональному онтогенезі від статевозрілих самиця, які піддавалися гірудовпливу у передкоїтальному та післякоїтальному періодах. А – коркова речовина, Б – мозкова речовина, n = 20 для кожної підгрупи тварин.

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

Аналіз кореляційних взаємозв'язків між показниками маси тіла та лімфоїдних органів приплоду щурів, котрі зазнали гірудовпливу у перикоїтальному періоді, дає уявлення про взаємозв'язок між загальним морфогенезом та морфогенезом в імунній системі цих тварин. Отримані нами результати засвідчили позитивний вплив біологічно активних медіаторів медичної п'явки, отриманих самицями, на загальний морфогенез та морфогенез лімфоїдних органів приплоду. У приплоду самиць дослідної групи виявлено гармонізацію розвитку тимусу і селезінки, порівняно з новонародженими щурами контрольної групи, про що свідчать підвищені показники позитивного кореляційного взаємозв'язку між індексами маси цих органів (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Кореляція між показниками маси тіла та лімфоїдних органів статевозрілих самиць щурів та їх приплоду в постембрональному онтогенезі, r

Показники	Група тварин	Самиці	1-ша доба	15-та доба	30-та доба	45-та доба	60-та доба
Маса тимусу – 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
Маса тіла – 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
Маса тіла – 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.

Достовірних відмінностей між показниками кореляційного взаємозв'язку між загальним показником маси та показниками маси аналізованих лімфоїдних органів у приплоду самиць контрольної і дослідної груп нами не виявлено. Слід відмітити втрату позитивного з одночасним формуванням помірною

негативного кореляційного зв'язку між показниками маси лімфоїдних органів та між загальним показником маси тіла і показником маси селезінки у самиць, що зазнали гірудовпливу.

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ ВОДНО-СОЛЬОВОГО ЕКСТРАКТУ *HIRUDO VERBANA*, ЗАСТОСОВАНОГО САМИЦЯМ ЩУРІВ У ПЕРЕД- ТА ПІСЛЯ КОЇТАЛЬНОМУ ПЕРІОДАХ, НА ЇХ ІМУННУ РЕАКТИВНІСТЬ ТА ІМУННИЙ СТАТУС ПРИПЛОДУ В ДИНАМІЦІ ПОСТЕМБРІОНАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗУ

Експериментальні дослідження цього розділу присвячені вивченню впливу водно-сольового екстракту із тіл медичної п'явки виду *Hirudo verbana* у передкоїтальному та після коїтальному періодах лабораторним статевозрілим самицям щурів та їх приплоду в динаміці постембріонального онтогенезу, на тіж показники, як при гірудологічному впливі.

4.1 Гематологічні показники, морфометричні характеристики тіла та лімфоїдних органів приплоду в постембріональному онтогенезі за впливу водно-сольовоно екстракту *Hirudo verbana* статевозрілим самицям щурів у передкоїтальному та після коїтальному періодах

При дослідженні статевозрілих самиць щурів, які були виведені з експерименту після вигодовування та відсадки від них приплоду, в цілому не викликало істотних змін у прирості маси тіла їх приплоду та показника маси лімфоїдних органів в порівнянні з контрольною групою тварин табл. 4.1 та табл. 4.2. Тільки у приплоду досліджених самиць щурів на 15-ту добу досовірне збільшення маси тіла на 13,08% та 30-ту добу - 26,75% табл. 4.1.

Слід відмітити, що самиці також, як при гірудологічному впливі у середньому народжували більшу кількість приплоду (9-11 щурят), вони були теж більш активніші, в порівнянні з контрольною групою (5-6 щурят).

Таблиця 4.1

Фізичні параметри тіла самиць щурів та їх приплоду в постембріональному онтогенезі за впливу екстракту МП

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

При аналізі лімфоїдних органів імунної системи дослідних статевозрілих самиць зареєстроване достовірне збільшення всіх морфометричних показників органів порівняно з контрольною групою (табл.4.2).

У їх приплоду також, як і у самиць, супроводжувалося позитивне збільшення показників лімфоїдних органів (табл.4.2). Так, під впливом МП у порівнянні з контролем, достовірно збільшувалася маса тимусу: на першу добу та 30-ту на добу (на 17,97%) та маса селезінки: на 15-ту добу (на 7,98%) та 30-ту добу (на 41,42%).

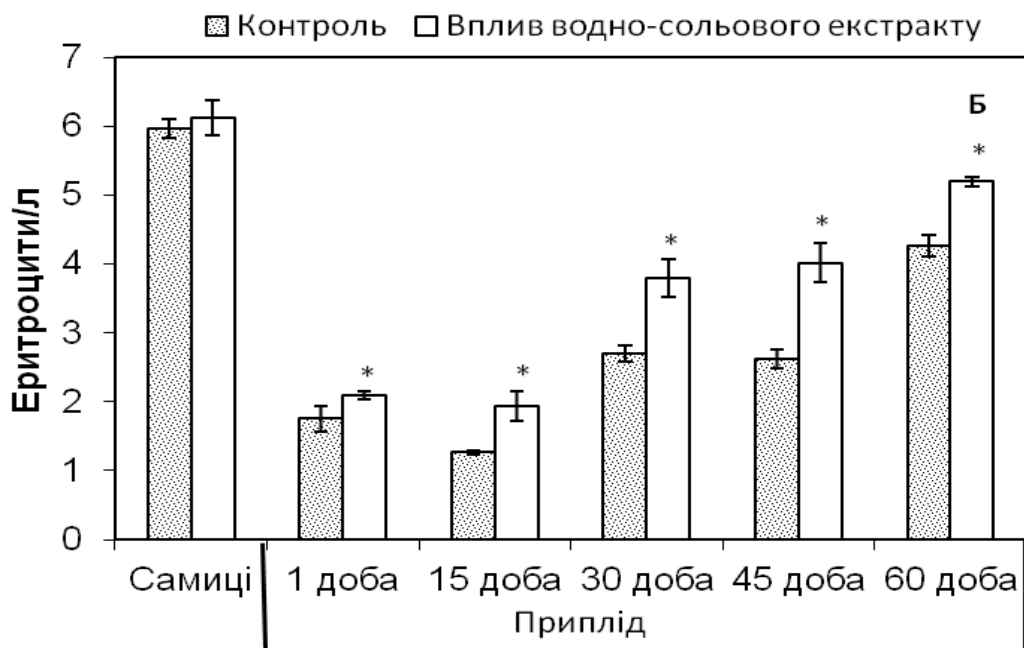
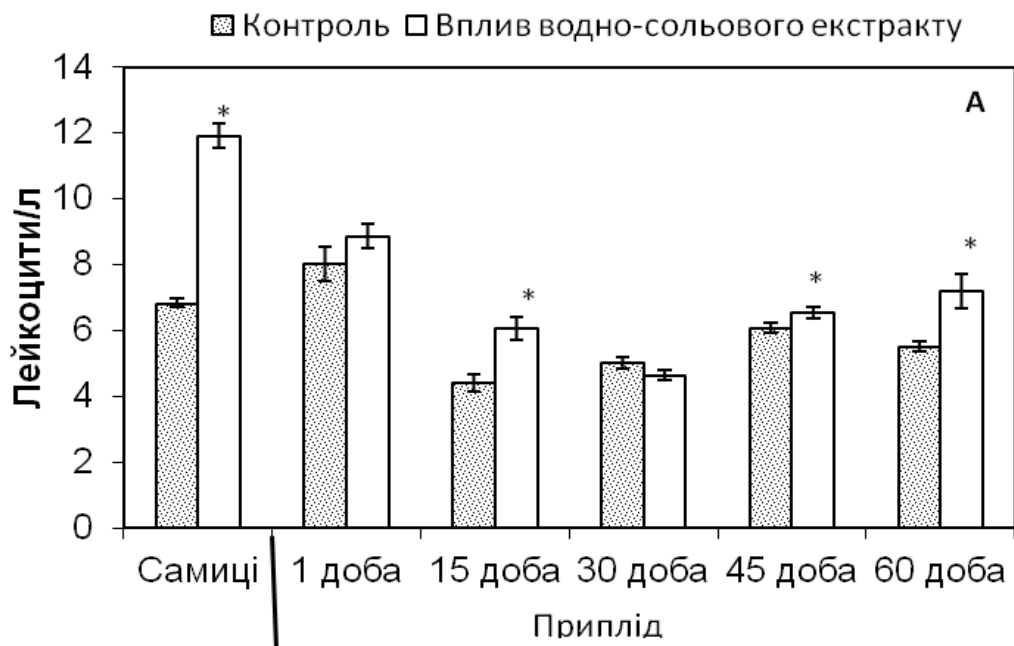
Таблиця 4.2

Морфометричні показники лімфоїдних органів у самиць шурів та їх приплоду в постембріональному онтогенезі за впливу екстракту МП

Показники лімфоїдних органів (X ± SE)							
Група тварин		Тимус			Селезінка		
		Маса (мг)	Довжина (см)	Ширина (см)	Маса (мг)	Довжина (см)	Ширина (см)
Самиці	Контроль, n=20	268,41 ± 11,41	1,45 ± 0,03	1,21 ± 0,03	465,03 ± 23,33	3,21 ± 0,09	0,71 ± 0,03
	Екстракт, n=20	345,11 ± 17,01*	1,64 ± 0,09*	1,52 ± 0,08*	566,11 ± 53,40*	3,58 ± 0,09*	0,91 ± 0,04*
Приплід							
1 доба	Контроль, n=20	15,50 ± 0,61	0,47 ± 0,02	0,35 ± 0,01	22,00 ± 0,91	1,32 ± 0,05	0,22 ± 0,01
	Екстракт, n=20	17,21 ± 0,69*	0,44 ± 0,02	0,33 ± 0,01	21,01 ± 0,84	1,10 ± 0,04*	0,72 ± 0,03*
15 доба	Контроль, n=20	88,60 ± 3,5	0,83 ± 0,03	0,73 ± 0,03	72,61 ± 2,90	1,60 ± 0,06	0,36 ± 0,01
	Екстракт, n=20	85,61 ± 3,3	0,92 ± 0,04*	0,82 ± 0,03*	78,90 ± 3,01*	1,68 ± 0,06	0,30 ± 0,01
30 доба	Контроль, n=20	251,01 ± 10,11	1,44 ± 0,06	1,24 ± 0,05	140,01 ± 5,60	2,14 ± 0,08	0,48 ± 0,02
	Екстракт, n=20	306,00 ± 12,00*	1,41 ± 0,06	1,43 ± 0,06*	239,00 ± 9,51*	2,13 ± 0,08	0,67 ± 0,03*
45 доба	Контроль, n=20	266,01 ± 10,61	1,50 ± 0,06	1,25 ± 0,05	253,02 ± 10,10	2,35 ± 0,10	0,62 ± 0,03
	Екстракт, n=20	254,02 ± 9,00	1,51 ± 0,06	1,30 ± 0,05	273,00 ± 10,91	2,63 ± 0,11*	0,63 ± 0,02
60 доба	Контроль, n=20	460,00 ± 18,41	1,77 ± 0,07	1,63 ± 0,06	522,00 ± 20,91	3,13 ± 0,12	0,81 ± 0,03
	Екстракт, n=20	447,11 ± 16,30	1,61 ± 0,06*	1,80 ± 0,07*	549,01 ± 22,01	3,60 ± 0,11*	0,77 ± 0,03

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

Порівняльний аналіз лейкоцитарної формули крові у дослідних групах самиць щурів не виявив системних відмінностей між контрольною групою тварин (табл.4.3). У дослідній групі самиць вміст гемоглобіну (на 23,56%) (рис. 4.1, В). Позитивні зміни в лімфоїдних органах сприяли підвищенню показників лейкоцитів та еритроцитів у крові дослідженої групи щурів (рис. 4.1, А, Б). Так статистично значуще підвищення кількості лейкоцитів у самиць (на 41,02%) та приплоду на 15-ту (на 26,67%), 60-ту добу (на 37,5%) $p < 0,05$.



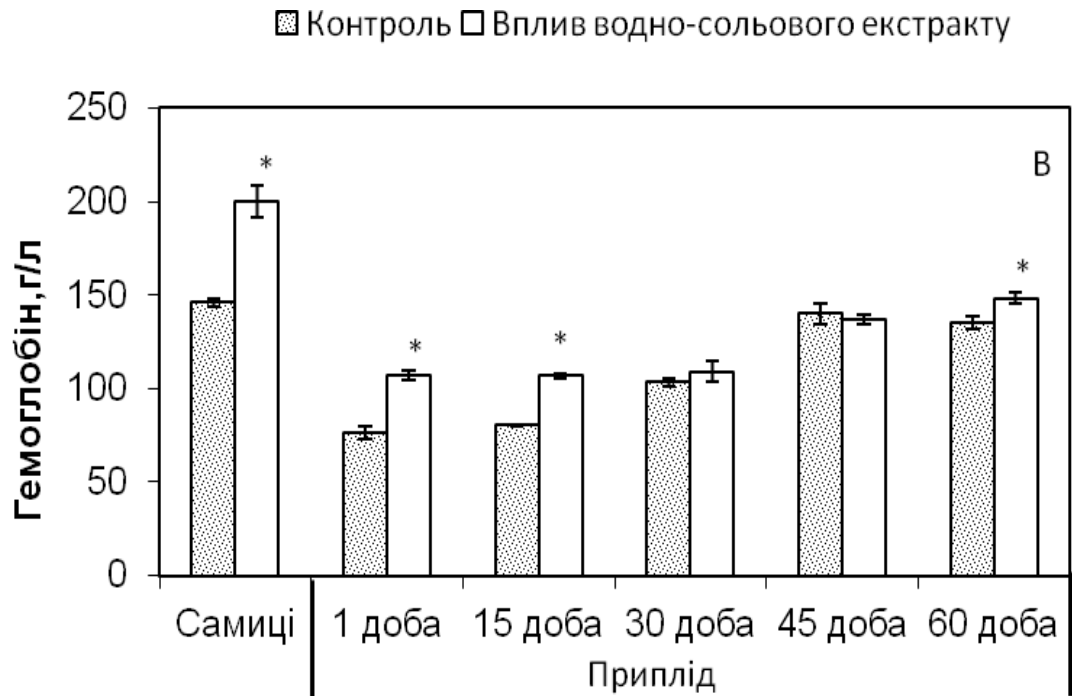


Рисунок 4.1. Гематологічні показники самиць щурів та їх приплоду в постембріональному онтогенезі за впливу водно-сольового екстракту *Hirudo verbana*. А – абсолютна кількість лейкоцитів, Б – абсолютна кількість еритроцитів, В – вміст гемоглобіну; $n = 20$ для кожної підгрупи тварин.

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

Кількість еритроцитів у дослідній групі приплоду збільшувалася в всіх термінах спостереження, статистично значимого зсуву рівня відзначали на 15-ту (на 35%) та 30-ту (на 26,31%) добу $p < 0,05$ (рис. 4.1, Б). Таке контрастне підвищення еритропоезу можна пояснити підвищенням потреби в обміні речовин. Паралельно з кількістю еритроцитів підвищувався рівень гемоглобіну з достовірним значущим відхиленням від контролю, на першу (на 30,91%) та 60-ту (на 9,69%) добу $p < 0,05$ (рис. 4.1, В). При аналізі відносного співвідношення популяцій лейкоцитів у лейкоцитарній формулі крові вплив МП на гомеостатичне диференціювання лейкоцитів в мієлопоезі та лімфопоезі у дослідній групі тварин, в межах фізіологічної норми (табл.4.3). Однак, слід зазначити наявність впливу МП на зміни диференціювання популяцій лейкоцитів у приплоду дослідної групи самиць, у межах фізіологічних норм. Так, на першу добу зсув лейкоцитарної формули крові вліво зменшувався за

рахунок зниження клітин вродженого імунітету (гранулоцитів та моноцитів) та збільшення клітин адаптивного імунітету (лімфоцитів), що свідчить про прискорену диференційовку лімфоїдної системи, у напрямок дорослих тварин за рахунок дії МП.

Таблиця 4.3

Лейкоцитарна формула крові самиць щурів та їх приплоду в постембріональному онтогенезі за впливу екстракту

МП

Група тварин		Лейкоцити/ л ($\times 10^9$)	Лейкоцитарна формула крові, % ($X \pm SE$)					
			Еозинофі- ли	Нейтрофіли			Лімфоцити	Моноцити
				Паличко- ядерні	Сегменто- ядерні	Загальний відсоток		
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Самиці	Контроль, n=20	6,83 \pm 0,13	0,45 \pm 0,07	7,70 \pm 1,25	18,70 \pm 1,99	26,40 \pm 2,40	70,80 \pm 0,99	2,35 \pm 0,52
	Екстракт, n=20	11,90 \pm 0,37*	0,40 \pm 0,06	6,00 \pm 0,80	17,70 \pm 1,22	24,70 \pm 2,25	72,10 \pm 1,01	2,80 \pm 0,66
Приплід								
1 доба	Контроль, n=20	8,02 \pm 0,54	0,52 \pm 0,07	33,67 \pm 1,39	15,33 \pm 2,14	49,00 \pm 2,98	47,15 \pm 1,93	3,33 \pm 0,63
	Екстракт, n=20	8,86 \pm 0,36	0,64 \pm 0,08	21,67 \pm 3,02*	16,05 \pm 0,36	37,72 \pm 2,01*	58,38 \pm 2,09 *	3,26 \pm 0,44
15 доба	Контроль, n=20	4,40 \pm 0,26	0,21 \pm 0,04	3,80 \pm 0,67	9,40 \pm 1,14	13,20 \pm 3,38	82,21 \pm 0,94	2,40 \pm 0,49
	Екстракт, n=20	6,06 \pm 0,35 *	0,14 \pm 0,02	5,27 \pm 1,21	10,75 \pm 1,49	16,02 \pm 3,19	81,38 \pm 0,78	2,50 \pm 0,34

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5	6	7	8	9
30 доба	Контроль, n=20	5,02 ± 0,18	0,41 ± 0,05	3,00 ± 0,34	2,65 ± 0,11	5,65 ± 2,42	88,95 ± 0,50	4,99 ± 0,22
	Екстракт, n=20	4,64 ± 0,07	0,50 ± 0,07	3,72 ± 1,85	2,75 ± 0,61	6,47±3,57	87,78 ± 1,47	5,25 ± 0,50
45 доба	Контроль, n=20	6,07 ± 0,15	0,20 ± 0,09	2,05 ± 0,45	6,05 ± 0,71	8,10 ± 1,22	89,35 ± 1,07	2,35 ± 0,56
	Екстракт, n=20	6,54±0,16*	0,30 ± 0,10	2,15 ± 0,66	6,75 ± 1,21	8,90 ±3,25	87,45±1,74	2,75±0,41
60 доба	Контроль, n=20	5,50 ± 0,16	0, 81 ± 0,11	4,82 ± 0,95	5,76 ± 0,60	10,58 ± 3,04	86,76 ± 1,62	2,65 ± 0,12
	Екстракт, n=20	7,20±0,53*	0,88 ± 0,17	4,88±1,86	6,17 ± 1,51	11,05±3,11	85,01 ± 1,80	3,06 ± 0,59

Примітка: * - $p < 0,05$ порівняно із контрольною групою; %- відносне значення.

4.2 Поглинальна активність та оксидативний метаболізм нейтрофілів крові самиць та їх приплуду в постембріональному онтогенезі

При дослідженні поглинаючої активності нейтрофілів, у тварин під впливом водно-сольового екстракту медичної п'явки, відмічається збільшення ФІ: на 1-шу добу (на 28,89%) та у самиць (на 19,35%) $p < 0,05$ (рис. 4.2, А). ФЧ значимо збільшується: на 15-ту (на 37,85%), 30-ту (на 30,28%) та 45-ту (на 19,37%) добу $p < 0,05$ (рис. 4.2, Б).

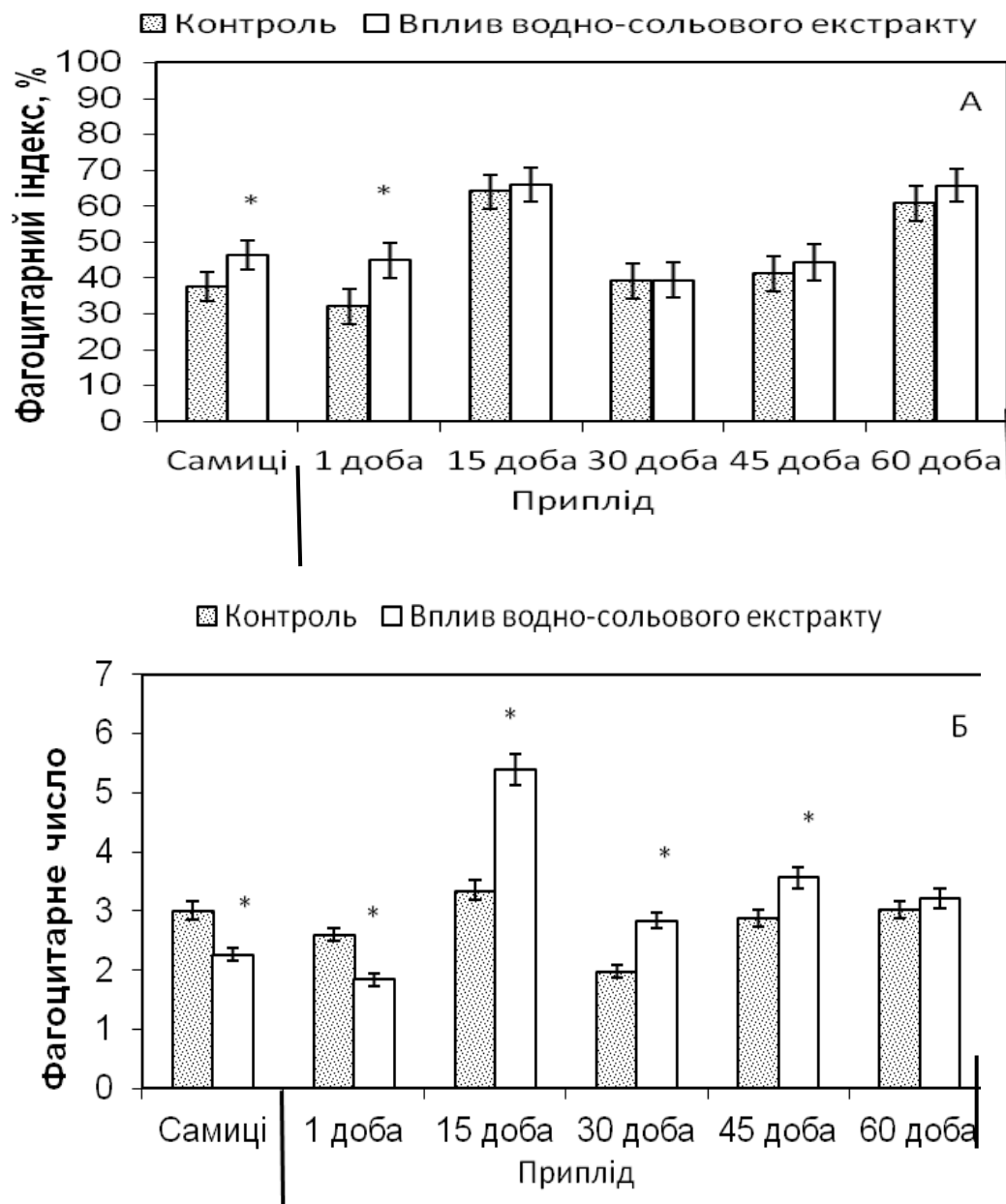


Рисунок 4.2. Фагоцитарна активність нейтрофілів крові самиць щурів та їх приплуду в постембріональному онтогенезі за впливу водно-сольового

екстракту *Hirudo verbana*. А – фагоцитарний індекс, Б – фагоцитарне число; $n = 20$ для кожної підгрупи тварин. Примітка: * - $p < 0,05$ порівняно із контрольною групою.

Аналізуючи ОМН у самиць щурів та їх приплоду під впливом водно-сольового екстракту медичної п'явки НСТ спонтанний тест значимо збільшується у самиць (на 41,02%) та її приплоду на всіх термінах дослідження: на 15-ту (на 23,15%), 30-ту (на 21,35%), 45-ту (на 30,84%) та 60-ту (на 40,05%) добу порівняно з контролем (рис. 4.3, А), таке ж статистичне збільшення при дослідженні НСТ стимульованого тесту, у самиць (на 42,98%) та її приплоду на 15-ту (на 21,83%), 30-ту (на 20,27%), 45-ту (на 20,00%) та 60-ту (на 21,57%) добу (рис. 4.3, Б).

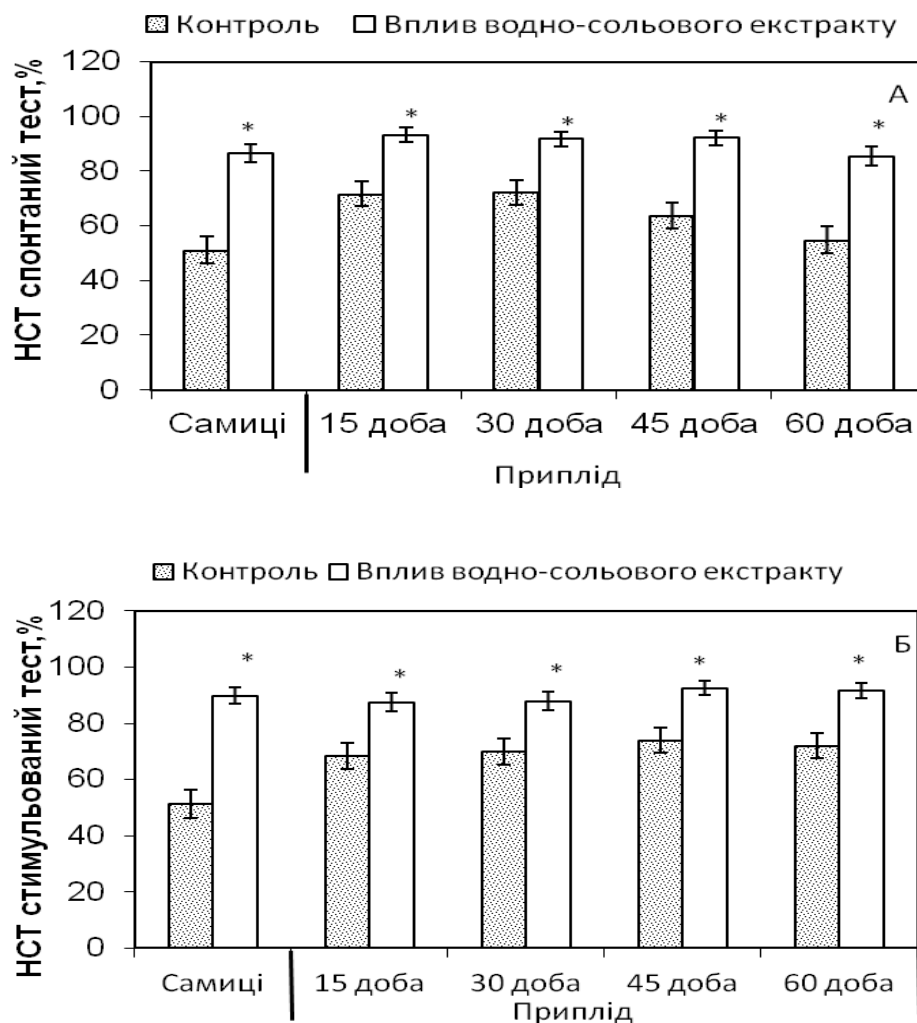


Рисунок 4.3. Оксидативний метаболізм нейтрофілів крові самиць щурів та їх приплоду в постембріональному онтогенезі за впливу водно-сольового

екстракту *Hirudo verbana*. А – НСТ спонтаний, Б – НСТ стимульований; n = 20 для кожної підгрупи тварин.

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

4.3 Проліферативна активність лімфоцитів крові самиць та їх приплоду в постембріональному онтогенезі

У результаті дослідження, у статевозрілих самиць шурів контрольної та дослідної груп тварин, при стимуляції рослинним мітогеном та екстрактом тканин п'явки, збільшується відсоток бластних клітин (рис.4.4). Так, на стимуляцію КонА - 61,27%, на екстракт тканин медичної п'явки - 37,33% у контрольній групі, відносно спонтанним культурам, а у дослідній групі відносно спонтанним культурам, КонА на 62,55% та екстракт тканин МП на 64,28 %. Таку ж тенденцію до збільшення виявлено і у їх приплоду на всіх етапах досліду. У дослідної групи статевозрілих самиць та у їх приплоду на всіх етапах розвитку порівняно з контрольною групою, у всіх культурах крові значне збільшення бластнотрансформованих лімфоцитів ($p < 0,05$). Збільшена реакція лімфоцитів на екстракт тканин п'явки *Hirudo verbana*, що вказує на його поліклональну активацію, як і на рослинний лектин. Так, у статевозрілих самиць РБТЛ на екстракт тканин МП, як у контрольній групі так і у дослідній значно перевищували спонтанні культури ($p < 0,05$). Таку ж динаміку відмічали і у їх приплоду. РБТЛ на екстракт із тканин МП наближалися до показників, як на рослинному лектині КонА.

РБТЛ, також морфологічно відрізнялися. Бласти, стимульовані рослинним лектином, були типові за морфологією. При стимуляції екстрактом тканин МП бласти мали недостатньо розвинену цитоплазму та знижену її базофільність, як результат недостатнього розвитку білок-синтетичної системи.

У культурах в які додавали екстракт тканин МП стимульовані лімфоцити мали признаки апоптозу: цитопікноз, каріопікноз, вакуолізація ядра та цитоплазми. В таких культурах також зустрічались некротичні лімфоцити у

вигляді оксифільних плям. Апоптоз та некроз лімфоцитів може, свідчити про протизапальну дію п'явки.

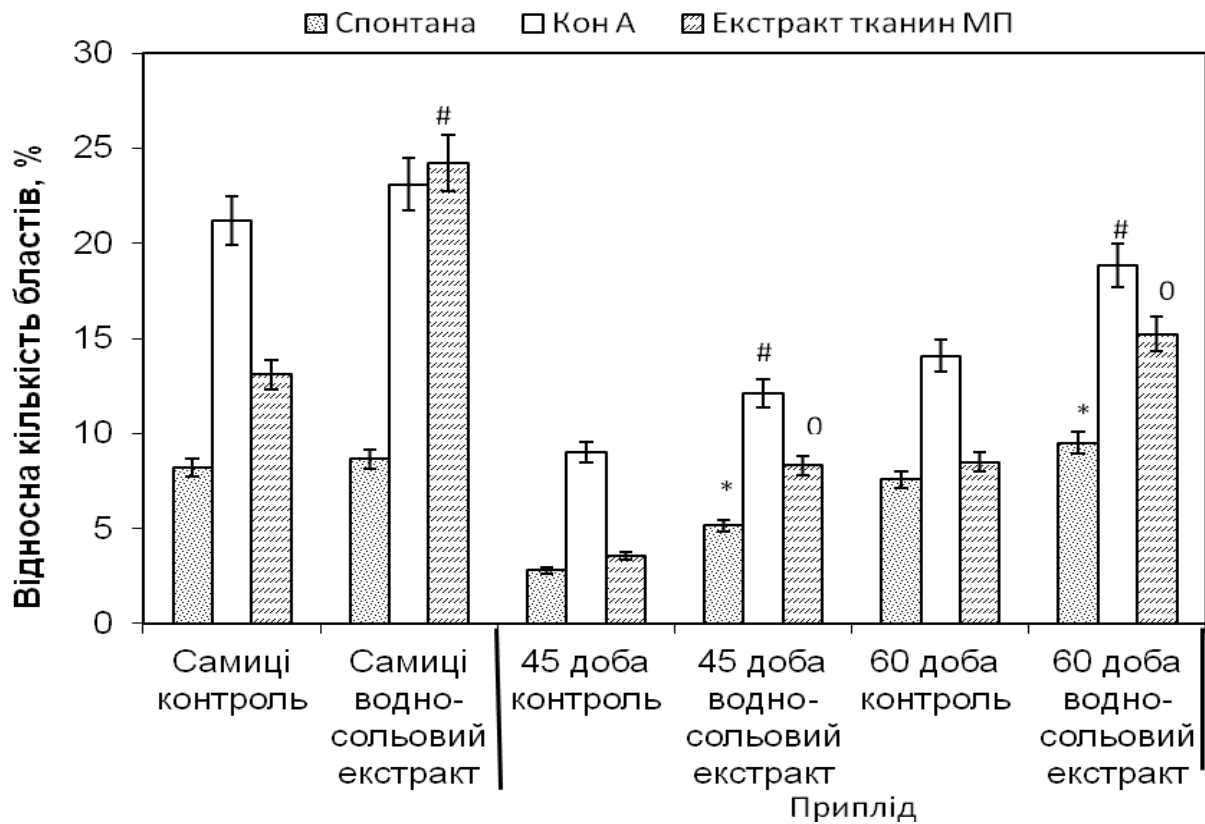


Рисунок 4.4. Проліферативна активність лімфоцитів крові самиць щурів та їх приплоду в постембріональному онтогенезі за впливу водно-сольового екстракту *Hirudo verbana*.

Спонтана – без додавання стимуляторів, Кон А – культура з додаванням рослинного мітогену, екстракт тканин МП – культура з додаванням водно-сольового екстракту *Hirudo verbana*; $n = 20$ для кожної підгрупи тварин. Примітка: * - $p < 0,05$ порівняно із спонтанними культурами контрольної групи, # - $p < 0,05$ порівняно із Кон А культурами контрольної групи, 0 - $p < 0,05$ порівняно із екстракт тканин МП контрольної групи.

Разом з тим збільшення РБТЛ на екстракт тканин МП порівняно зі спонтанними культурами, можна пояснити наявністю загальних паттернів у структурній організації усіх видів Царств.

4.4 Мітотичний індекс кісткового мозку самиць щурів та їх приплоду в постембріональному онтогенезі

При аналізі проліферуючої активності клітин кісткового мозку (рис.4.5) у дослідної групи самиць мітотичний індекс достовірно збільшився на 33,61% порівняно с контрольною групою тварин ($p < 0,05$). У їх приплоду максимальне підвищення мітотичного індексу спостерігали у дослідної групи на першу добу (на 50,88%) порівняно с контрольною групою тварин ($p < 0,05$). Достовірне підвищення проліферативної активності клітин кісткового мозку спостерігали і у інші терміни спостереження: на 30-ту добу (на 25,67%) та на 60-ту добу (на 18,35%) ($p < 0,05$) порівняно з контрольною групою тварин. Тенденція до збільшення мітотичного індексу спостерігалася на 15-ту (16,83%) та 45-ту добу (на 33,3%).

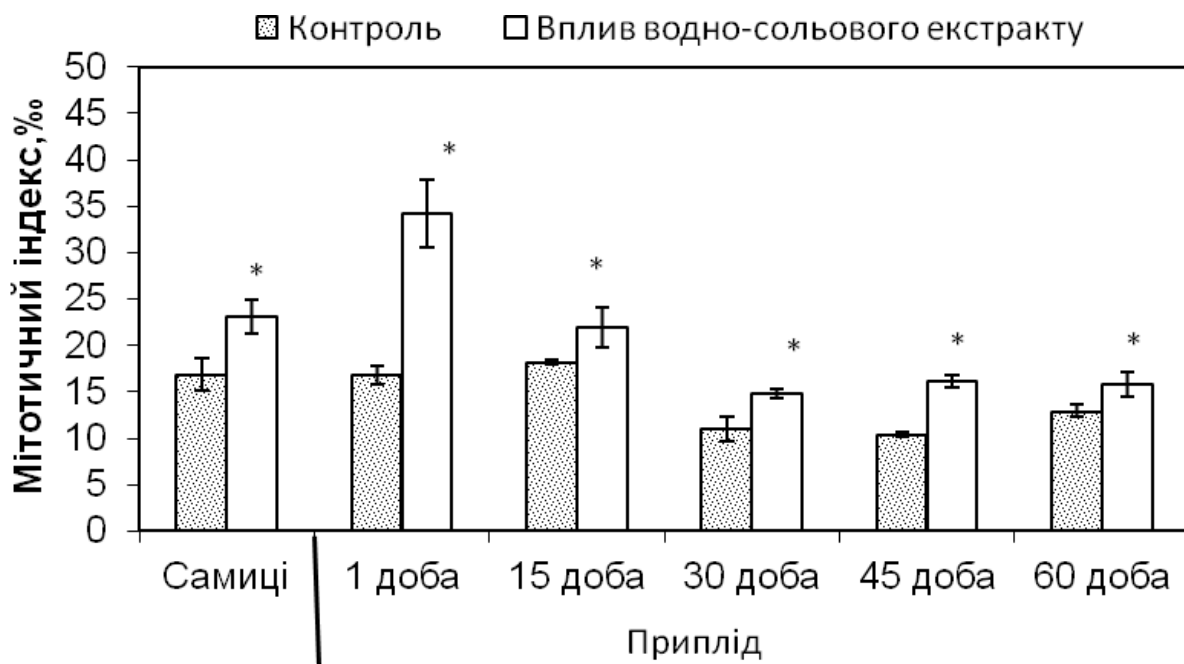
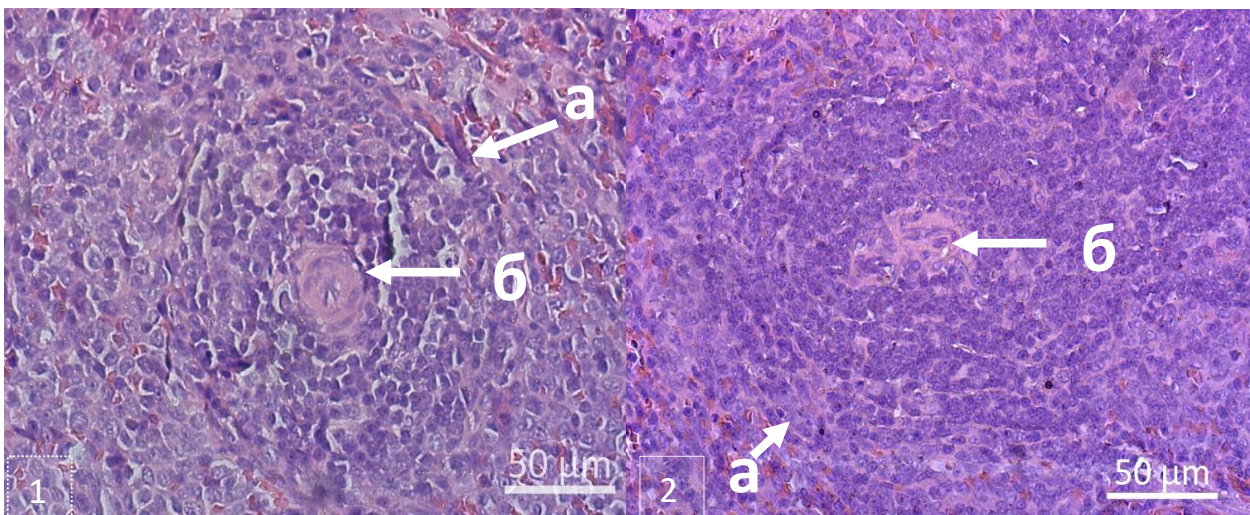


Рисунок 4.5. Проліферативна активність кісткового мозку приплоду в постембріональному онтогенезі за впливу водно-сольового екстракту *Hirudo verbana* статевозрілим самицям у передкоїтальному та післякоїтальному періодах; $n = 20$ для кожної підгрупи тварин.

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

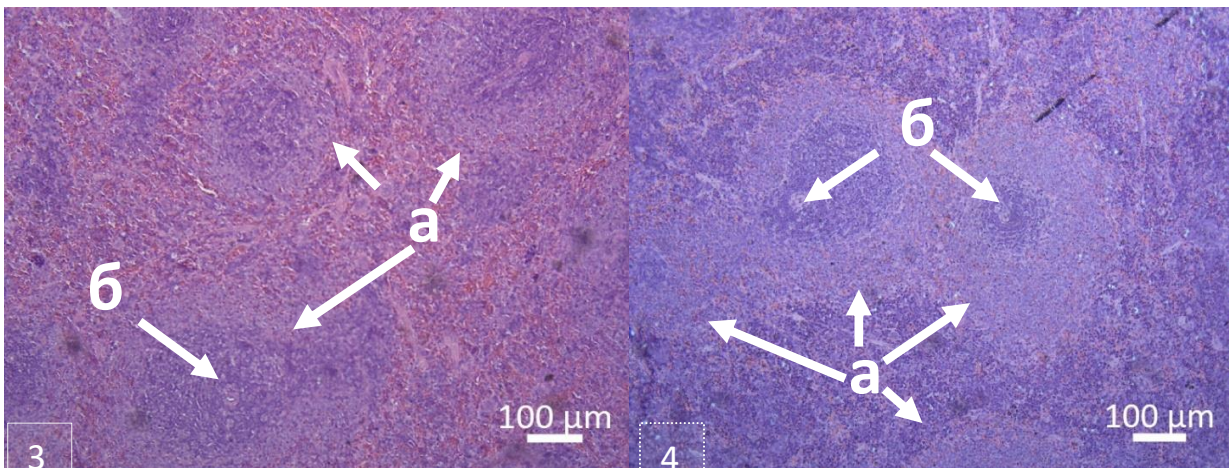
4.5 Цитоморфологічні показники селезінки та тимусу статевозрілих самиць шурів та їх приплоду в постембрональному онтогенезі. Кореляція між показниками маси тіла та лімфоїдних органів статевозрілих самиць шурів та їх приплоду в постембрональному онтогенезі

При дослідженні морфологічних показників селезінки за впливу водно-сольового екстракту МП, у приплоду порівняно з контрольною групою тварин збільшується кількість лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм^2) лімфоїдного фолікула, збільшується площа та діаметр лімфоїдного фолікулу, площа та діаметр, товщина центральних артерій лімфоїдного фолікула. Переважання мегакаріоцитів $p < 0,05$, що свідчить про вплив екстракту медичної п'явки на тромбоцитопоез. (табл.4.4 рис. 4.6).



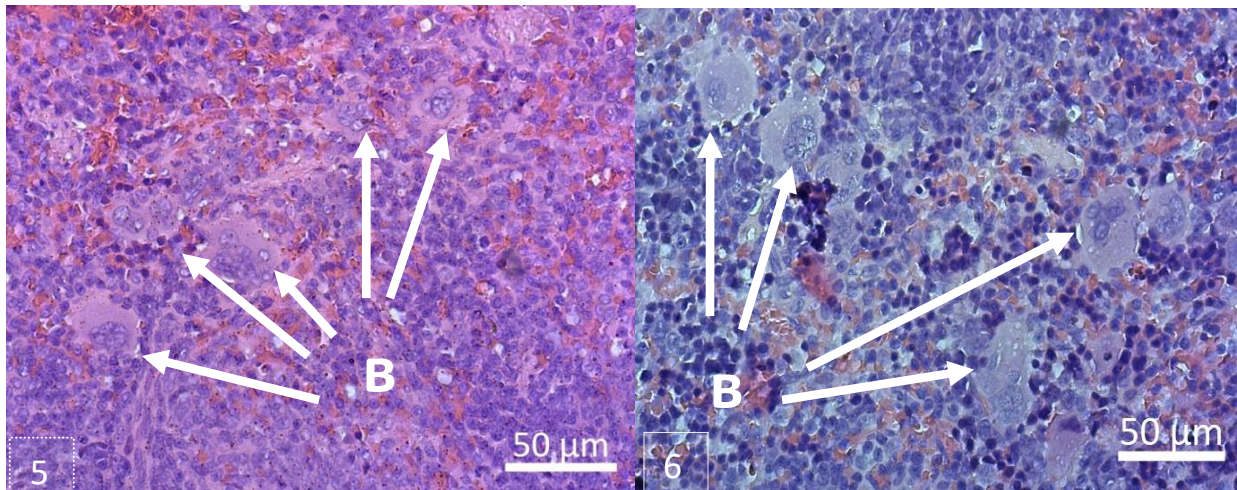
1 - Контроль 30 доба ЛФ

2 – Екстракт МП 30 доба ЛФ



3- Контроль 30 доба селезінка

4- Екстракт МП 30 доба селезінка



5- Екстракт МП 30 доба мегакаріоцити 6 Екстракт МП 60 доба мегакаріоцити

Рисунок 4.6. Гістологічний препарат селезінки приплоду самиць щурів, котрі зазнали впливу водно-солового екстракту *Hirudo verbana* у перед- та посткоїтальному періодах (1, 2, 5, 6 збільшення - х600, 3, 4 – х100). Примітка: а – лімфоїдний фолікул, б – артерія, в – мегакаріоцити; n = 20 для кожної підгрупи тварин, ЛФ –лімфоїдний фолікул.

Аналізуючи білу пульпу селезінки у самиць збільшується площа (на 69,96 %) та діаметр (на 37,94%) лімфоїдного фолікула, збільшується площа (на 63,89%), діаметр (на 46,42%) та товщина (на 48,52%) центральних артерій лімфоїдного фолікула.

При аналізі лімфоїдного фолікула у селезінці їх приплоду: на 15-ту добу збільшується площа (на 43,77%) та діаметр (на 21,89%); на 30-ту добу збільшується площа (на 19,2%), діаметр (на 16,29%) та кількість лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм²) (на 35,75%); на 45-ту добу збільшується площа (на 49,26%), діаметр (на 20,52%) та кількість лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм²) (на 24,09%); на 60-ту добу збільшується площа (на 32,04%) та діаметр (на 10,82%).

Таблиця 4.4

Морфологічні показники білої пульпи селезінки самиць та їх приплоду в постембріональному онтогенезі

Група тварин		Лімфоїдний фолікул				Центральна артерія		
		Площа, мкм ²	Діаметр мкм	Кількість лімфоцитів в на 400 мкм ² ЛФ	Кількість макрофагів на 400 мкм ² ЛФ	Площа, мкм ²	Діаметр мкм	Товщина мкм
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Самиці	Контроль, n=20	15302,3±1353,9	137,8±15,8	16,1±0,5	–	831,5±165,9	27,1±2,2	9,4±0,6
	Екстракт, n=20	50944,8±1976,2 *	222,1±21,3 *	15,3±0,6	–	2302,4±439,1 *	50,6±5,1 *	18,3±3,2 *
Приплід								
1 доба	Контроль, n=20	5550,4±785,1	75,8±0,8	7,7±0,8	–	373,5±83,3	21,4±2,6	5,5±2,0
	Екстракт, n=20	5287,7±736,9	75,5±4,8	10,1±0,4 *	–	349,0±60,0	21,0±1,8	9,6±0,8 *
15 доба	Контроль, n=20	18936,1±2033,8	154,8±14,1	11,0±0,3	0,22±0,05	819,6±170,8	29,8±3,2	10,2±1,6
	Екстракт, n=20	33676,8±3079,3 *	198,2±21,7 *	11,0±0,5	0,19±0,01	1442,7±208,6	41,6±5,2 *	16,3±2,8 *
30 доба	Контроль, n=20	23293,0±1943,4	167,0±11,9	8,4±0,3	0,20±0,03	479,5±83,9	23,0±2,2	7,7±0,3
	Екстракт, n=20	28843,2±1945,3 *	199,5±9,0 *	13,1±0,3 *	0,17±0,03	728,4±69,5 *	31,4±1,9 *	8,6±0,3 *

Продовження таблиці 4.4

1	2	3	4	5	6	7	8	9
45 доба	Контроль, n=20	52347,0±7780,7	275,3±37,6	12,3±0,3	–	1314,2±484,5	37,0±6,2	11,6±1,1
	Екстракт, n=20	103160,0±9333,3 *	346,3±23,7*	16,2±0,5*	–	1348,4±211,7	39,8±3,2	15,1±1,4*
60 доба	Контроль, n=20	35263,22±3292,0	238,2±18,3	11,3±0,8	0,58±0,13	818,0±286,6	30,6±5,0	5,6±0,9
	Екстракт, n=20	51886,10±3888,6 *	267,1±18,7*	12,7±0,8	0,68±0,2	819,1±382,4	29,2±6,1	8,1±1,2*

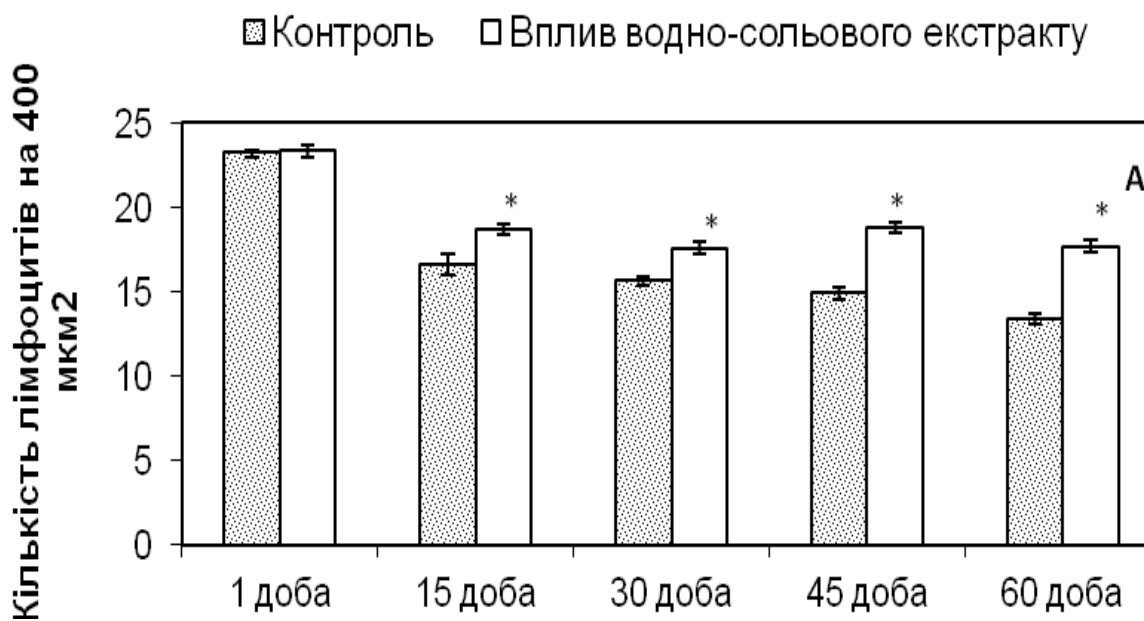
Примітка: * - $p < 0,05$ порівняно із контрольною групою

При дослідженні центральних артерій у лімфоїдному фолікулі тенденція до збільшення їх площі, довжини, товщини у самиць та її приплоду на 15 та 30-ту добу. При аналізі тимусу самиць щурів, він зазнає інволюції в обох групах, а у тимусі приплоду в кірковій та мозковій речовині збільшується кількість клітин на одиницю площі (400 мкм²), переважає кіркова речовина тимусу над мозковою.

Досліджуючи кіркову речовину приплоду збільшується кількість клітин на одиницю площі на 15-ту (10,99%), 30-ту (11,20%), 45-ту (20,82%) та 60-ту (24,38%) добу. При дослідженні мозкової речовини збільшується кількість клітин на одиницю площі на 30-ту (5,54%) (рис.4.7).

Отриманні данні свідчать про стимулюючий вплив екстракту тканин *Hirudo verbana* на вторинний (селезінку) та первинний (тимус) орган імунної системи.

Кіркова речовина тимусу



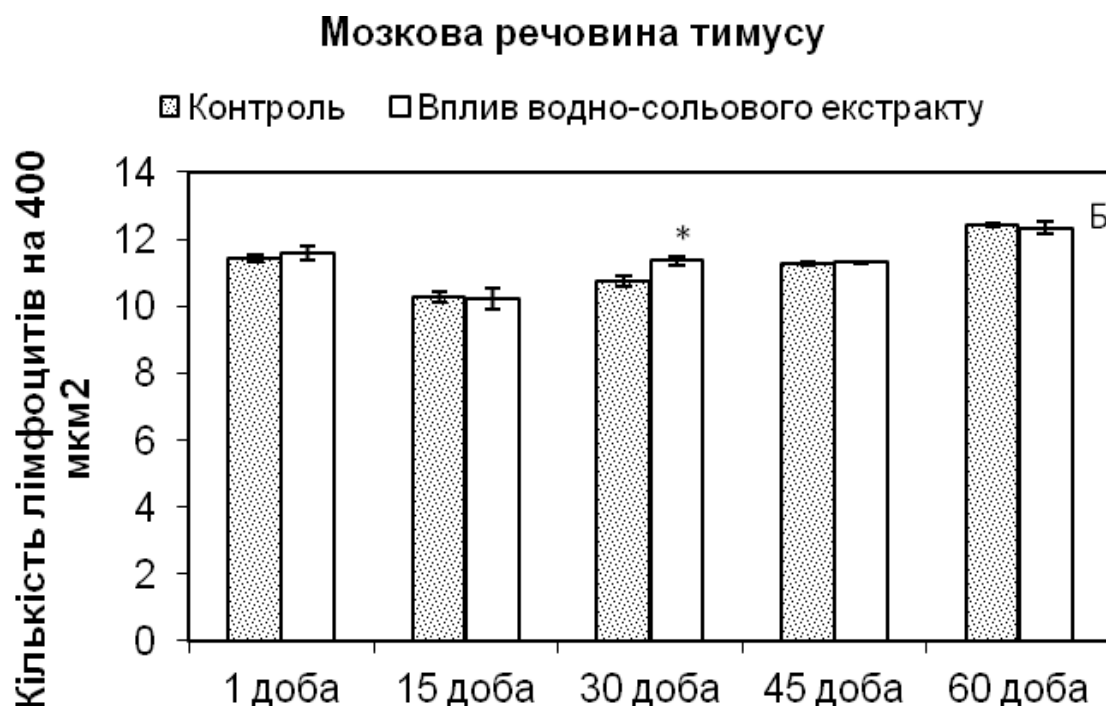


Рисунок 4.7. Кількість лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм²) речовин тимусу приплоду в постембріональному онтогенезі від статевозрілих самиць, які піддавалися впливу водно-солевого екстракту *Hirudo verbana* у передкоїтальному та післякоїтальному періодах. А – коркова речовина, Б – мозкова речовина; n = 20 для кожної підгрупи тварин.

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

Дослідження кореляційних взаємозв'язків між показниками маси тіла та лімфоїдних органів приплоду щурів, котрі зазнали впливу водно-солевим екстрактом МП у перикоїтальному періоді, також підтверджує взаємозв'язок між загальним морфогенезом та морфогенезом в імунній системі цих тварин, як при гірудовпливі.

Отримані нами результати засвідчили позитивний вплив екстракту тканин медичної п'явки, отриманих самицями, на загальний морфогенез та морфогенез лімфоїдних органів приплоду. У приплоду самиць дослідної групи виявлено гармонізацію розвитку тимусу та селезінки, порівняно з новонародженими щурами

контрольної групи, про що свідчать підвищені показники позитивного кореляційного взаємозв'язку між індексами маси цих органів (табл. 4.5).

Таблиця 4.5

Кореляція між показниками масою тіла та лімфоїдних органів статевозрілих самиць щурів та їх приплоду в постембрональному онтогенезі, r

Показники	Група тварин	Самиці	Приплід				
			1 доба	15 доба	30 доба	45 доба	60 доба
Маса тимусу – селезінки	Контроль, n=20	1,00*	0,69*	0,18	0,00	0,09	0,46*
	Екстракт, n=20	1,00*	0,53*	0,99*	0,58*	-0,08	0,57*
Маса тіла – тимусу	Контроль, n=20	-0,03	0,00	0,95*	0,77*	0,09	0,74*
	Екстракт, n=20	0,71*	0,56*	0,88*	0,00	-0,32	0,78*
Маса тіла – селезінки	Контроль, n=20	-0,03	0,00	0,48*	0,00	0,13	0,54*
	Екстракт, n=20	0,69*	0,96*	0,84*	0,00	-0,04	0,80*

Примітка: * – достовірний кореляційний взаємозв'язок між показниками.

Слід відмітити достовірні відмінності показників кореляційного взаємозв'язку між загальним показником маси тіла та показниками маси аналізованих лімфоїдних органів у самиць та їх приплоду порівняно з контрольною групою тварин.

Участь в морфогенезі не тільки тимусу, але і лімфоїдної частини селезінки, можна пояснити відмінностями в дозі та способі введення водно-сольового екстракту МП, у порівнянні з її приставкою при гірудовпливі. У разі останнього способу речовини МП поширюються в організмі тварин, в основному лімфогенно та через периферичні кровоносні капіляри. При цьому МП при годуванні сама визначає опосередкованість введення їх речовин та їх дозування залежності від періоду акту смоктання: на початку і в середині - деструктивні та гемостатичні компоненти, у

другій половині харчування - протизапальні та ймовірно, регенеруючі та стимулюючі компоненти. При внутрішньочеревному, дозованому водно-сольовим екстрактом із тіл МП, їх речовини здебільшого надходять в периферичний венозний кровотік, активну участь в дренуванні, якого приймає селезінка.

Стимуляція лімфоїдних фолікулів селезінки водно-сольовим екстрактом, ймовірно мало місце і у ембріонів в перші два тижні вагітності, що мало б відбитися і на розвитку цього органу. Дане припущення підтвердилося при аналізі кореляційних зв'язків показників у приплоду.

Високий позитивний зв'язок між цими показниками, також прямо вказує на залежність гістогенетичних реакцій від функціонального стану досліджуваних первинного та вторинного органів імунної системи тварин.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Згідно даних літератури в теперішній час із-за побічних реакцій від медикаментозного лікування [254, 255], медико-біологічне співтовариство науковців, все більше досліджує натуротерапевтичні методи лікування, які скорочують побічні ефекти, в порівнянні з синтетичними лікарськими засобами. Один із яких є гірудотерапія (ГТ). Терапевтичні ефекти ГТ обумовлені складом у секреті слинних залоз медичної п'явки (МП) більше 100 біологічно активних речовин, що не мають аналогів у світі та необхідні в сучасній ветеринарії та медицині — гірудин, егліні, бделіні, ферменти: гіалуронідаза, дестабілаза, колагеназа, апіраза, еластаза. [1, 8]. Такий багатокomпонентний склад секрету слинних залоз п'явки забезпечує протиішемічну, сосудорухливу, ліполітичну, знеболюючу, імуномодулюючу, антикоагулюючу, тромболітичну, протизапальну та бактерицидну дію та інші дії. ГТ та фармакологічні препарати на основі слини п'явки ефективно використовують, як в медицині, так і у ветеринарії. Людина та водопойні тварини (в основному копитні) мутуалістично адаптовані до медичної п'явки, в процесі багатомільйонної еволюції при гірудологічних контактах. Тому ГТ забезпечує широкий спектр терапевтичних ефектів при практично відсутності побічних негативних наслідків.

Нами було досліджено імунотропну дію МП в експериментах *in vivo* та *in vitro*. В експерименті на лабораторних щурах виявлено, що при впливі слини та водно-сольового екстракту з тканин МП *Hirudo verbana* статевозрілим самицям у передкоїтальний та після коїтальний періодах, стимулюється імунна система самих статевозрілих самиць та їх приплоду в ранньому постембріональному онтогенезі. При аналізі дослідних груп тварин встановлено, що слина та водно-сольовий екстракт МП проявляють виражену морфогенетичну дію на самиць та їх приплід в постембріональному онтогенезі, яка зареєстрована на організменому, тканинному та клітинному рівнях протягом 60 діб спостереження після останньої приставки МП щурам. У наших дослідженнях активно проявлявся 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, що в повній мірі пояснює в наших дослідках збільшення еритроцитарних (кількість еритроцитів, гемоглобін), лейкоцитарних (кількість лейкоцитів, функціональну активність нейтрофілів) показників крові, що в свою чергу впливають на ріст та розвиток фізичних параметрів тіла та лімфоїдних органів імунної системи (селезінки та тимусу) [256-263]. Причому пролонгована стимуляція морфогенезу у дослідній групі щурів, окрім можливого депонування в тканинах залишкових кількостей слини та водно-сольового екстракту МП, більш ймовірно, обумовлено основною функцією імунної системи - контроль та регуляції гістогенезу усіх тканин, яка за багатьма дослідниками називається морфогенетичною функцією імунної системи [264, 265].

Приведений висновок базується на наших попередніх експериментальних даних [258-263] та багатьма даними інших дослідників [266-280]. Так, в наших дослідках під впливом МП відбувалось збільшення маси щурів у дослідній групі, морфологічних параметрів тіла та лімфоїдних органів [281-288]. Стимуляції МП лімфоїдних органів забезпечила збільшення кількісних та функціональних показників (еритроцитарних та лейкоцитарних) самиць та їх приплоду в постембріональному онтогенезі [281-288]. Гемостатичний вплив МП здійснювався в гомеостатичних межах норми, на що також вказує онтогенетично збалансована лейкоцитарна формула крові в порівнянні з контрольними групами, а також відсутність тератогенних ознак у дослідній групі тварин. На морфогенетичну, або ремодулюючу, по номінації іншими авторами [289-291], функцію імунної системи вказують дані літератури про периферичну інфільтрацію лейкоцитами, зокрема популяціями та субпопуляціями лімфоцитів, у жінок в процесі оваріального циклу [289, 290]. Широке обговорення отримала 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 архітекτονіки органів, наприклад печінки, у інтактних тварин при адоптивному переносі їм аутоклонів Т - і В - лімфоцитів від дослідних щурів, на тлі репаративної регенерації органів після

операційної їх резекції [291]. При цьому міграційна інфільтрація лімфоцитів передують активні регенераційні процеси 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 [292]. Таким чином, Бабаєва А.Г. та її співавтори, вважають, що імунні клітини, окрім захисних імунних реакцій, виконують морфогенетичну функцію, яка забезпечує гістогенез та репарацію будь-якого відновлювального росту, як одна із фундаментальних властивостей лімфоїдних клітин.

Участь морфогенетичної функції у фізіологічних та репаративних гістогенезах підтверджується також, даними імуноморфологів [265]. Вони 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 [265].

Особливість онтогенетичних параметрів пулу активованих Т- і В - лімфоцитів в периферичній крові людей, також свідчить про основну морфогенетичну функцію імунної системи [293]. Так, у дітей до пубертатного періоду кількість активованих лімфоцитів в периферичній крові, які зберігали ознаки попереднього лімфогенезу та імуногенезу коливаються в межах 35-50%, тоді, як у дорослих (середнього віку), у яких завершений ріст та розвиток організму, кількість таких лімфоцитів коливається в межах 20-35% та підтримується відносно на постійному онтогенетичному рівні, навіть в ізольованих зразках крові після екстримальної холодової інкубації при + 4 ° [294]. Окрім того, всі численні дані літератури про ремодуляцію фізіологічної та репаративної регенерації під впливом гірудотерапії, та її імунологічні ефекти, також вносять певний внесок у доведення морфогенетичної функції імунної системи [291-299]. Отримані нами експериментальні результати, також збігаються з даними про

морфологічні зміни у кіз після курсів гірудологічних приставок. Так, в період роздоювання у тварин підвищувалася маса тіла, збільшувалася молочність без ускладнення маститом, а в репродуктивний період відзначалося 100% запліднення, народження двійнят із збільшеною масою в порівнянні з контрольною групою [152]. При досліджах, які були проведені на коровах, гірудопунктура сприяла прискореній післяпологовій реабілітації, зворотній інволюції репродуктивних органів до фізіологічного стану [35-39, 153].

Морфогенетична функція імунної системи логічно впливає з даних численних авторів про наявність аутоантитіл та аутосенсibilізованих Т- і В-лімфоцитів до будь-яких структур клітин та тканин [299-303]. Вони вважають, що усі новостворені Т- та В-лімфоцити є помірними аутоклонами до будь-яких структур клітин та тканин. На цьому припущенні А.Б. Полетаєв (2010 рік) та його послідовники висунули гіпотезу про «Імункулюс» - наявність набору циркулюючих аутоантитіл, що відображають структурну організацію організму [299-303]. Дана гіпотеза є гомологічною до «Гомункулюс» - рецепторну організацією центральної нервової системи, тестуючу стан організму [299-303]. Експериментальні дослідження проведені Полетаєвим А. Б. [304] 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 органні, тканинні та загальноорганізмені функціонально-метаболічні перебудови, в тому числі, що мають діагностичне та прогностичне значення.

Отримані наші результати збігаються, також з іншими даними провідних науковців, щодо участі в регуляції регенераторного 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 [305]. Передбачається, що незабаром після часткової гепатектомії купферовські клітини починають виділяти в мікросередовище фактори, що стимулюють проліферацію гепатоцитів [273]. На моделях часткової

гепатектомії та крововтрати 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 [273]. На участь нейтрофілів в регуляції регенераторного процесу вказують дослідження І. І. Долгушина та О. В. Бухаріна [274], які на моделі адаптивного перенесення показали, що перитонеальні нейтрофіли інтактних мишей F1 (СВА × С57BL) при трансплантації сингенним тваринам зі стандартною опіковою травмою (25-30% поверхні тіла) помітно прискорюють епітелізацію рани. Цей стимулюючий ефект автори пов'язують з секретуючими нейтрофілами низькомолекулярними пептидами. Тучні клітини беруть участь в регенераторному 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 і еозинофіли [277]. Таким чином, в даний час вже показано, що різні елементи імунної системи беруть участь в регуляції регенераторного процесу.

Нами також, встановлений позитивний вплив слини та водно-сольового екстракту МП у лабораторних щурів самиць та їх приплоду в постембріональному онтогенезі на фагоцитарну активність нейтрофілів, яка проявляється підвищенням її порівняно з контрольними групами тварин [306 - 308]. Відомо, що зниження ФАН веде до хронізації запального процесу та сприяє підтримці алергії та аутоалергії [233]. Підвищення показників ФАН при ГВ пов'язано з активацією вродженого імунітету під впливом МП, і відповідає даним інших авторів [1, 8, 12]. При аналізі оксидативного метаболізму нейтрофілів у самиць щурів та їх приплоду за впливу слини та водно-сольового екстракту МП у дослідних тварин достовірно збільшуються НСТ- спонтанний та НСТ – стимульований тести порівняно з контрольною групою тварин. Такі зміни показників функціональної активності нейтрофілів крові щурів пов'язані з активацією вродженого імунітету під впливом МП, і відповідають даним інших авторів [1, 12].

Вплив МП на проліферативну активність лімфоцитів ми вивчали у культурі з цільною кров'ю щурів стимульованих рослинним мітогеном та водно-сольовим екстрактом із тканин МП, яка *in vitro* демонструє активаційні та проліферативні потенції лімфоцитів. В добових мітогенстимульованих (КонА) культурах лімфоцитів щурів до ГВ спостерігались проліферативні реакції у вигляді бластів, рівні якої відповідали імунному потенціалу даного віку, а також природі відповідного мітогену. Подібна реакція, але з підвищенням її рівня спостерігалась і після ГВ. Навпаки порівняно з рослинним мітогеном МП стимулювали непродуктивний імуногенез, який виражався появою лімфоцитів із морфологічними ознаками апоптозу та некрозу, що, ймовірно, є її провідним механізмом протизапальної дії. Збільшення рівня РБТЛ вище спонтанного під впливом МП у тварин, які раніше не контактували з ними, можна пояснити наявністю загальних участків (патернів) у білковій організації всіх видів. За сучасними уявленнями структурні патерни [309, 310] являють собою філогенетично стабільні, обмежені 8-10 - 20 мономерами послідовності біополімерів подібні у представників різних філогенетичних груп. Видова різноманітність молекулярних патернів також обмежена близько 20 [311]. З цих позицій отримує логічне пояснення також факт підвищення РБТЛ після ГВ, як результат збільшення в рециркуляції сенсibiliзованих до аптечної МП лімфоцитів, які мають спільні патерни з іншими видами. Перевищення РБТЛ на МП порівняно із спонтанними культурами навіть у контрольних самиць, можна пояснити поліклональністю цих речовин, а досягнення РБТЛ на МП рівня поліклонального активатора лімфоцитів Кон А у дослідної групи самиць тварин, підтверджує гетерофільність патернів усіх форм клітинного Життя. При цьому, якщо врахувати, що більшість стимулюючих лімфоцитів на МП проявляли ознаки апоптозу та некрозу, то запрограмована смерть імунокмпитентних клітин є філогенетичним завданням МП, як абсолютного гемофага - пригнічити імунологічну реакцію з'їденої крові [312]. Даний факт також був відзначений у культурі лімфоцитів людини на МП [297]. Виявлені значно низькі показники РБТЛ в культурі лімфоцитів крові у приплоду порівняно із дорослими

самицями, як у контрольній, так і у дослідній групі тварин, свідчить про відомий факт, щодо імунологічної незрілості цих клітин на даному онтогенезі у щурів [185].

При аналізі кореляційних зв'язків нами виявлена середня та сильна кореляція між масою тимусу (первинного органу імунної системи) та масою селезінки (вторинного органу імунної системи) із масою тварин. Даний факт підтверджує пряму участь імунітету в зростанні та розвитку організму щурів, у його фізіологічній регенерації клітин та тканин органів. При цьому імуотропний ефект МП сприяє перш за все стимуляції розвитку органів імунної системи, що як правило підсилює кореляційну залежність. Активуючи морфогенетичні реакції у дослідних тварин призводило, також до збільшення поліморфізму аналізованих ознак, що у ряді випадків знижувало кореляційний зв'язок, або навіть змінювало його на негативний. Також, слід відмітити, що самиці також, як при гірудологічному впливі так і введенні водно-сольового екстракту, у середньому народжували більшу кількість приплоду (9-11 щурят), вони були більш активніші, в порівнянні з контрольною групою (6 щурят).

Нами також виявлені деякі відмінності в стимулюючому ефекті слини при гірудовпливі та водно-сольовому екстракті із тканин МП. У першому випадку помітно переважав вплив тимічних над селезінковими факторами, тоді як в іншому їх активність частіше зрівнювалися. Дана особливість впливу МП на імунну систему, ймовірно, залежала від способу їх поширення в організмі дослідних тварин, так при ГВ речовини МП розповсюджуються переважно лімфогенно, а при внутрішньочеревному введенні водно-сольового екстракту їх компоненти в більшості попадали в кров, а далі в селезінку, як дренальний орган за більшістю своїх функцій.

Отримані результати збігаються про філоонтогенетичний зв'язок імунологічних реакцій: фактори вродженого імунітету ініціюють імунологічні реакції адаптивного імунітету [313]. При цьому всі експериментальні дослідження проведенні багатьма дослідниками про роль імунної системи в підтриманні морфогенезу також, підтверджуються нашими дослідженнями. Однак опосередкований вплив МП на потомство дослідних щурів нами було виявлено вперше.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вирішено актуальне наукове завдання – досліджено вплив медичної п'явки на імунну реактивність самиць щурів та їх приплоду в постембріональному онтогенезі. Встановлено, що медичні п'явки посилюють, як вроджену, так і адаптивну імунну реактивність тварин, що супроводжується підвищенням приросту маси приплоду.

1. Застосування гірудовпливу самицям щурів у перед- та після коїтальному періоді супроводжувалося збільшенням показника приросту маси їх приплоду в динаміці онтогенезу, в середньому на 14,1%, порівняно з контролем. Введення водно-сольового екстракту *Hirudo verbana* не викликало значних змін приросту маси приплоду.

2. Гірудовплив та введення водно-сольового екстракту з тканин МП спричиняє збільшення кількості лімфоцитів у тимусі та лімфоїдних фолікулах селезінки, збільшення площі лімфоїдних фолікулів, переважання білої пульпи та збільшення частки мегакаріоцитів порівняно з контролем.

3. Введення водно-сольового екстракту з тканин та застосування гірудовпливу самицям щурів спричинило збільшення мітотичного індексу кісткового мозку в їх приплоду, в середньому на 32,5% та 38% відповідно, порівняно з контролем.

4. Застосування гірудовпливу спричинило статистично вірогідне збільшення кількості циркулюючих лейкоцитів у самиць та їх приплоду на початкових стадіях постембріонального онтогенезу, збільшення кількості циркулюючих еритроцитів у самиць, а також помірне збільшення рівня гемоглобіну в тварин. Уведення водно-сольового екстракту з тканин МП викликає вірогідне збільшення циркулюючих лейкоцитів лише в самиць, помірне збільшення кількості еритроцитів у приплоду та збільшення рівня гемоглобіну у самиць та їх приплоду на початкових стадіях постембріонального онтогенезу, в середньому, на 21%.

5. Як введення водно-сольового екстракту з тканин, так і застосування гірудовпливу спричинило статистично вірогідне збільшення поглинальної активності нейтрофілів у самиць (на 19,35% та 37,5% відповідно), та у їх приплоду

на початкових стадіях постембріонального онтогенезу (на 29% та 37% відповідно) порівняно з контролем. Введення водно-сольового екстракту з тканин та застосування гірудовпливу спричинило посилення оксидативного метаболізму нейтрофілів, як у самиць (на 41% та 30% відповідно), так і у їх приплоду на початкових стадіях постембріонального онтогенезу (на 25% та 27% відповідно) порівняно з контролем.

6. Застосування гірудологічного впливу та введення водно-сольового екстракту з тканин МП самицям спричиняло посилення проліферативної відповіді їх лімфоцитів на екстракт медичної п'явки у середньому на 32%, а також спонтанної та стимульованої проліферативної активності лімфоцитів у їх приплоду: спонтанної (на 38,64 та 27,34% відповідно), у відповідь на Кон-А (на 50,93% та 26% відповідно), у відповідь на екстракт тканин МП (на 53,64% та 48,42%).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Каменев ОЮ, Барановский АЮ. Лечение пиявками: теория и практика гирудотерапии: руководство для врачей. СПб: Весь, 2006. 304 с.
2. Hildebrandt JP, Lemke S. Small bite, large impact—saliva and salivary molecules in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*. *Naturwissenschaften*. 2011; 12 (98): 995-1008.
3. Baskova IP. *Hirudotherapy scientific basements. Humoral link*. Tula: Akvarius, 2015. 228 с.
4. Егорова СН, Гарифуллина ГХ. Фармацевтическое консультирование: пиявка медицинская (*Hirudo medicinalis*). *Медицинский вестник Башкортостана*. 2016; 5: 19-24.
5. Коньртаева НН, Иванов СВ, Каусова ГК, и др. Гирудотерапия в Казахстане: контингент пациентов и приверженность к лечению. *Экология человека*. 2016; 2: 42-48.
6. Dong H, Ren JX. Chinese Medicinal Leech: Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Pharmacological Activities. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2016; 2016: 7895935.
7. Крашенюк АИ, Крашенюк СВ, Чалисова НИ, винахідники; Крашенюк АИ, Крашенюк СВ, Чалисова НИ, 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 РО. Імуномодуляторні властивості біологічно активних речовин медичної п'явки в умовах гірудовпливу. [Дис. канд. біол. наук: 03.00.09.]. К.: ДВНЗ Київський національний університет. 2016. 169 с.
9. Su B, Wang ZB, Guo YD, et al. Research on the method of fibrinogen-thrombin time by coagulometer for quality control of *Hirudo*. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2014; 34(10): 1802–1806.
10. Xiao L, Xu XL, He KY, Chen KL. Assay of anticoagulation activity of leeches by using biological standardization method. *Chinese Pharmaceutical Journal*. 2015; 50(3): 258–262.

11. Nowak G, Schröer K. Hirudin—the long and stony way from an anticoagulant peptide in the saliva of medicinal leech to a recombinant drug and beyond—a historical piece. *Thrombosis and Haemostasis*. 2007; 1 (98): 116-119.
12. Фролов ВМ, Гарник ТП, Пересадин НА, Высоцкий АА. Динамика показателей фагоцитарной активности моноцитов периферической крови у больных с синдромом психоэмоционального выгорания при гирудотерапии. *Український медичний альманах*. 2008; 4 (11): 175-178.
13. Денискина ЕВ. Клинико-лабораторное обоснование гирудотерапии в комплексном лечении хронического верхушечного периодонтита. [Дис. канд. мед. наук: 14.00.21.]. Москва: Московский государственный медико-стоматологический университет. 2003. 160 с.
14. Боровая ЕП. Гирудотерапия и эндоекологическая реабилитация в комплексном санаторно-курортном лечении больных ишемической болезнью сердца среднего и пожилого возраста. [Автореф. дис. канд. мед. наук: 14.00.53.]. Москва: ФГУ Российский научно-исследовательский институт геронтологии Росздрава. 2008. 22 с.
15. Селезнев КТ. Место гирудотерапии в стоматологической практике. *Стоматология*. 2002; 1: 35-38.
16. Савинов ВА. Гирудотерапия. Москва: Медицина, 2004. 432 с.
17. Зельоний П, Кузнецова ЛВ, Фролов ВМ, Пересадин МО. 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.
18. Фролов АК, Токаренко АИ. Изменения иммунитета у больных гипертонической болезнью под влиянием биологически активных веществ медицинской пиявки. *Запорожский медицинский журнал*. 2011; 2 (13): 23-26.
19. Волощенко ЛГ, Хабаров АС, Зяблицкая НК, Шойхет ЯН, 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.

20. Спицына ВИ. Иммуные нарушения и патогенетическое обоснование их коррекции у больных хроническими заболеваниями слизистой оболочки полости рта. [Автореф. дис. докт. мед. наук: 14.00.21.]. Москва: Государственное предприятие Государственный научный центр "Институт повышения квалификации Федерального управления медико-биологических и экстремальных проблем". 2005. 20 с.

21. Глагович МВ. Лапаростомія та гірудотерапія в комплексному лікуванні перитоніту у дітей. [Автореф. дис. канд. мед. наук: 14.01.09.]. Київ: Національний медичний університет імені О.О. Богомольця. 2006. 19 с.

22. Захарова ОА. Патогенетическое обоснование гирудотерапии у больных суставной формой ревматоидного артрита. [Дис. канд. мед. наук: 14.00.16.]. Чита: ГОУВПО "Читинская государственная медицинская академия". 2008. 155 с.

23. Жаров ДГ. Секреты гирудотерапии или как лечиться пиявками. Ростов н/Д.: Феникс, 2003. 320 с.

24. Геращенко Л. Всё о пиявке. Гирудотерапия для разных типов людей. СПб.: Питер, 2007. 256 с.

25. Башкирцева НА. Лечимся пиявками. СПб.: Крылов, 2008. 128 с.

26. Баскова ИП, Исаханян ГС. Гирудотерапия. М.: Монолит, 2004. 508 с.

27. Whitaker IS, Rao J, Izadi D, Butler PE. Historical article: *Hirudo medicinalis*: Ancient origins of, and trends in the use of medicinal leeches throughout history. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 42:133–7.

28. Бургонский ВГ, Юркина АВ. Применение гирудотерапии в практической стоматологии. *Современная стоматология*. 2016; 1: 7-14.

29. Lissauer D, Kilby MD, Moss P. Maternal effector T cells within decidua: The adaptive immune response to pregnancy? *Placenta*. 2017; 60: 140-144.

30. Lee YC, Lin SJ. Natural killer cell in the developing life. *J Perinat Med*. 2015; 43(1): 11-7.

31. Hansen PJ, Denicol AC., Dobbs KB. Maternal embryokines that regulate development of the bovine preimplantation embryo. *Turk J Vet Anim Sci.* 2014; 38: 589-598.
32. Morelli SS, Mandal M, Goldsmith LT, Kashani BN, Ponzio NM. The maternal immune system during pregnancy and its influence on fetal development. *Research and Reports in Biology* 2015; 6: 171–189.
33. Alice G. Recent contributions to development of herbal-based immunomodulators for farm animals. *Cell Immunol Serum Biol.* 2017; 3(1): 68- 77.
34. Czech A, Grela ER, Mokrzycka A, Pejsak Z. Efficacy of mannanoligosaccharides additive to sows diets on colostrum, blood immunoglobulin content and production parameters of piglets. *Pol J Vet Sci.* 2010; 13(3): 525-531.
35. Рычапова ЛС. Опыт применения гирудотерапии при эндометритах у кошек и собака. *Успехи современной науки и образования.* 2017; 6(3): 182-185.
36. Попова ИС. Воспроизводительная способность молочных коров разных генотипов и использование гирудопунктуры для ее коррекции. [Автореф. дис. канд. вет. наук: 16.00.07.] Воронеж: Воронеж. гос. аграр. ун-т им. К.Д. Глинки. 2003. 21 с.
37. Демидчик ЛГ. Гирудотерапия при скрытом мастите коров. *Ветеринария. Реферативный журнал.* 2001; 2: 441.
38. Петров АН. Разработка и изучение механизмов действия гирудотерапии при мастите у коров. [Автореф. дис. канд. биол. наук: 16.00.04.]. Воронеж: Мичуринский государственный аграрный университет. 2000. 27 с.
39. Романова ЕМ, Климина ОМ, Козлова ЛА. Применение гирудотерапии и гирудоакупунктуры при субклинической форме мастита у коров. *Ветеринарный врач.* 2008; 4: 35–37.
40. Кондратьева ММ, Сидорова КА, Глазунова ЛА. Влияние гирудина на гематологические показатели у коров при субклиническом мастите. *Сельскохозяйственные науки.* 2015; 3(30): 58-63.
41. Глазунова ЛА, Анодина ММ. Гирудотерапия при лечении субклинических маститов у коров. *Современные проблемы науки и образования.* 2013; 6: 1060.

42. Коритнюк Р, Борисенко Т. Пиявочка–козявочка. Фармацевт–практик. 2009; 1: 34-27.
43. Abdulkader AM, et all. Leech Therapeutic Applications, Indian J Pharm Sci. 2013 Mar-Apr; 75(2): 127–137.
44. Trontelj P, Sotler M, Verovnik R. Genetic differentiation between two species of the medicinal leech, *Hirudo medicinalis* and the neglected *H. verbana*, based on random-amplified polymorphic DNA. Parasitol. Res. 2004; 94: 118-124.
45. Utevsky S, Kovalenko N, Doroshenko K, Petrauskiene L, Klymenko V. Chromosome numbers for three species of medicinal leeches (*Hirudo* spp.). Syst. Parasitol. 2009; 74: 95-102.
46. Trontelj P, Utevsky SY. Phylogeny and phylogeography of medicinal leeches (genus *Hirudo*): Fast dispersal and shallow genetic structure. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2012; 63: 475-485.
47. Siddall ME, Trontelj P, Utevsky SY, Nkamany M, Macdonald, KS, et. al. Diverse molecular data demonstrate that commercially available medicinal leeches are not *Hirudo medicinalis* Proc. R. Soc. B. 2007; 274: 1481-1487.
48. Николаев ВЮ. Разработка лечебно-профилактических, косметических пластырей с экстрактом медицинской пиявки. Достижения науки и образования. 2017; 6 (19): 92-94.
49. Tettamanti G, Grimaldi A, Rinaldi L, Arnaboldi F, Congiu T, Valvassori R, Eguileor M. The multifunctional role of fibroblasts during wound healing in *Hirudo medicinalis* (Annelida, Hirudinea). Biology of the Cell. 2004; 96: 443–455.
50. Shakouri A, Adljouy N, Abdolalizadeh J. Anti-Cancer Activity of liposomal Medical leech saliva extract (LSE). Proceedings of the 3rd World Congress on Recent Advances in Nanotechnology (RAN'18), 2018 April, Budapest, Hungary. Paper No. NDDTE XXX
51. Ojo PO, Babayi H, Olayemi IK, Peter OO, Fadipe LA, 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.

52. Жулебина НН. Гирудотерапия в дерматологии. *Bulletin of Medical Internet Conferences*. 2017; 7: 972.
53. Прохоров ДВ, Нгема МВ, Пияльцева ЕА. Опыт применения гирудотерапии в комплексном лечении хронических дерматозов. *Вестник физиотерапии и курортологии*. 2004; 3: 64-65.
54. Karadag AS, Calka O, Akdeniz N. A case of irritant contact dermatitis with leech. *Cecen I Cutan Ocul Toxicol*. 2011; 30: 234-235.
55. Агакишиев ДД, Гаджиева АТ, Гусейнов РР. Эффективность гирудотерапии при лейомиоме кожи. *Вестник последипломного образования*. 2006; 3-4: 36-37.
56. Kumar SA. Anti inflammatory effect of leech therapy in the patients of psoriasis (ek kusta). *J. Pharmaceut and Sci. Innovat*. 2012; 1(1): 71-74
57. Сенчукова СР, Журавлева ТА. Динамика индекса PASI больных псориазом при комплексном лечении с использованием гирудотерапии. *Фундаментальные исследования*. 2012; 8 (1): 149-152.
58. Кузнецова ЛП, Люсов ВА, Волов НА, Смирнова НА, Богданова ЛС. Место гирудотерапии в комплексном лечении хронической сердечной недостаточности. *Российский кардиологический журнал*. 2008; 2: 28-30.
59. Vallejo JR, González JA. The medical use of leeches in contemporary Spain: between science and tradition. *Acta med-hist Adriat* 2015; 13(1): 131-158.
60. Savrun A, Bozkurt S, Okumus M, Gokcen E, Turkaslan M. Prolonged bleeding on the neck in leech therapy: case report. *Arch Clin Exp Surg (ACES)*. 2015; 4: 234-237.
61. Кузнецова ЛВ, Фролов ВМ, Пересадин МО, Круглова ОВ. Сучасні підходи до гірудорефлексотерапії при захворюваннях серцево-судинної системи. *Український морфологічний альманах*. 2010; 8(1): 32-35.
62. Белецкая ТА, Комаровских ЕН. Возможности гирудотерапии в лечении больных первичной открытоугольной глаукомой. *Глаукома*. 2007; 4: 23-27.
63. Белецкая ТА, Комаровских ЕН. Эффективность гирудотерапии в лечении больных первичной открытоугольной глаукомой. *Офтальмология*. 2007; 4(4): 63-69.
64. Hosseinirad SA, Yaghoubi G, Haidari B. Misdiagnosis of Ocular Leech Infestation. *Journal of Surgery and Trauma*. 2017; 5(1-2): 36-38.

65. 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.
66. Кравченко А, Чхайло М. Актуальні проблеми корекції фізичного стану футболістів із вадами зору із застосуванням природних засобів. Фізичне виховання, спорт і культура здоров'я у сучасному суспільстві: Збірник наукових праць. 2008; 3: 69-73.
67. Самойлов АН, Зиганшин АУ, Егоров ЕА. Экспериментальные и клинические предпосылки для применения препарата Пиявит в офтальмологии. *Офтальмология*. 2006; 3(2): 65-66.
68. Борисенко ОМ, Бедзик ОВ, Міщанчук НС. Гірудотерапія при комплексному лікуванні осіб з гострою сенсоневральною приглухуватістю. *Журнал вушних, носових і горлових хвороб*. 2005; 3: 80-83.
69. Міщанчук НС. 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.
70. Щетініна ОО. 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.]. Київ: Академія медичних наук України Інститут отоларингології ім. Проф. О.С. Коломійченка. 2001. 19 с.
71. Кузьміна МБ. Гирудотерапия экссудативного среднего отита у детей. [Дис. канд. мед. наук: 14.00.04.]. Оренбург: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Оренбургская государственная медицинская академия федерального агентства здравоохранению и социальному развитию. 2006. 154 с.
72. Флаум РА, Шахов АВ. Применение гирудорефлексотерапии в лечении пациентов с заболеваниями внутреннего уха. *Медицинский альманах*. 2008; 2: 63-65.
73. Беляков КМ, Велиичко ЛА, Профьев АЛ, Смирнов АА. Опыт сочетанного применения мануальной и гирудотерапии при дискогенных пояснично-крестцовых радикулопатиях. *Мануальная терапия*. 2008; 4: 47-50.

74. Michalsen A, Klotz S, Lüdtkе R, Moebus S, Spahn G, Dobos GJ. Effectiveness of leech therapy in osteoarthritis of the knee: A randomized, controlled trial. *Ann. Intern. Med.* 2003; 139: 724-725.
75. Абдувалиев АА. Гирудотерапия в комплексном лечении больных реактивным артритом. *Лікарська справа.* 2003; 2: 42-45.
76. Абдувалиев АА, Дауреханов АМ. Гирудотерапия в комплексном лечении больных реактивным артритом. *Вестник КазНМУ.* 2017; 1: 250-252.
77. Васильева ЕА, Кобрин ВИ. 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.
78. Мосиянц ГГ, Лиев АА, Куликовский БТ. Сочетанное применение мануальной терапии и гирудорефлексотерапии при остеохондрозе поясничного отдела позвоночника. *Міжнародний неврологічний журнал.* 2009; 3: 43-44.
79. Michalsen A, Lüdtkе R, Cesur O, Afra D, Musial F, Baecker M, Fink M, Dobos GJ. Effectiveness of leech therapy in women with symptomatic arthrosis of the first carpometacarpal joint: a randomized controlled trial. *Pain.* 2008; 137(2): 452-459.
80. Харенко ВН, Фролов ВА. 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.
81. Лабінський ПА. Ефективність нетрадиційних методик лікування хронічної судинної патології головного мозку. *Практична медицина.* 2008; 1: 36-39.
82. Хинчагов БП, Айвазов ВН, Леонов ВЛ, Константиновская ГИ, и др. Эффективность и безопасность гирудотерапии при ишемических и цереброваскулярных заболеваниях. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры.* 2008; 4: 55-60.
83. Добрынин ЮВ, и др. Оценка эффективности секрета слюны пиявки в лечении цереброваскулярной и гинекологической патологии. *Вестник новых медицинских технологий.* 2008; 15(1): 96-97.

84. Морозова СВ, Аксенова ОВ. Гирудотерапия в лечении периферических кохлеовестибулярных нарушений сосудистого генеза. Вестник оториноларингологии. 2009; 4: 51-53.
85. Pospelova ML, Barnaulov OD. Effects of hirudotherapy on intravascular thrombosis activation in different groups of patients with cerebrovascular pathologies. *Aktuelnosti neurol, psihijatrije granicnih podrucja*. 2010; 18(1): 27-32.
86. Добрынина ИЮ, Живогляд РН, Хадарцева КА, Шипилова ТН. Гирудотерапевтическое управление гомеостазом человека при гинекологических патологиях в условиях Севера. Вестник новых медицинских технологий. 2005. Т. 12. № 2. С.25-27.
87. Баймурадова СМ. Гирудотерапия в профилактике у пациентов с синдромом потери плода и тромбофилией. *Аспирант и соискатель*. 2005; 3 (28): 136-139.
88. Сорокина АВ. Гирудотерапия в гинекологической практике. *Медицинская сестра*. 2008; 7: 19-20.
89. Wollina U, Heinig B, Nowak A. Medical leech therapy (Hirudotherapy). *Our Dermatol Online*. 2016;7(1):91-96.
90. Леонтьев ЕА. Гирудотерапия в комплексном лечении синдрома диабетической стопы. Вестник новых медицинских технологий. 2007; 14(3): 152–154.
91. Li WL, Zheng HC, 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.
92. 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.
93. Джигоев ИА. Методика гирудотерапии при лечении венозных трофических язв нижних конечностей в условиях поликлиники. *Аспирант и соискатель*. 2006; 4: 221–224.
94. 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 / T. Kensuke et al. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2016; 4: e1157.

95. Porshinsky BS, et al. Clinical uses of the medicinal leech: a practical review J. Postgrad. Med. 2011; 57: 65–71.
96. Ahmad T, Anwar M. Clinical importance of Leech therapy. Indian J. Tradit. Know. 2009; 8: 443–445.
97. Niqar Z, Alam MA. Effect of taleeq (leech therapy) in dawali (varicose veins). Anc. Sci. Life. 2011; 30: 84–91.
98. Pospelova ML, Barnaulov OD. Hirudotherapy in the treatment of bilateral internal carotid artery occlusion : case report. Curr. Top. Neurol. Psychiatr. Relat. Discip. 2010; 18: 51–53.
99. Prakash A, et al. A review on the role of jalaukavacharana (hirudotherapy) in the management of the venous ulcer. Universal Journal of Pharmacy. 2013; 2(4): 38-43.
100. Махова ЕВ. Особенности лечения варикозного расширения вен пиявками. Научный альманах. 2015; 11-4(13): 107-109.
101. Абальмасов ДВ, и др. Изучение показателей свободнорадикальных процессов и антиоксидантной защиты у лиц с заболеваниями слюнных желез, получающих гирудотерапию. Стоматология. 2004; 83(1): 27–29.
102. Вилова ТВ, и др. Микробиоценоз полости рта при использовании гирудотерапии в лечении гингивита. Экология человека. 2005; 8: 36–39.
103. Ткаченко ПІ, та ін. Гірудотерапія в комплексному лікуванні загострення хронічного паренхіматозного паротиту в дітей. Український стоматологічний альманах. 2006; 3: 63–65.
104. Зубкова ЛП, и др. Применение гирудотерапии в стоматологии. Український стоматологічний альманах. 2007; 1: 13–15.
105. Блинова ОА, и др. Пленки с препаратом медицинской пиявки. Фармация. 2005; 2: 18–20.
106. Herlin C, et al. Leech therapy in flap salvage: systematic review and practical recommendations. Ann Chir Plast Esthet. 2017; 62: 1–13.
107. Попов НС, и др. Морфологические изменения в коже крыс при наружном применении экстракта пиявки медицинской при термическом ожоге. Верхневолжский медицинский журнал. 2014; 12(2): 45-50.

108. Valerio E, et al. Use of *Hirudo medicinalis* in paediatric reconstructive surgery. *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2017; 2017: 1–2.
109. Митрофанов ИВ. Гирудотерапия в комплексном лечении пародонти. *Вестник новых медицинских технологий.* 2006; 13(1): 100.
110. Jha K, et al. Hirudotherapy in Medicine and Dentistry. *J Clin Diagn Res.* 2015; 9(12): ZE05- ZE07.
111. Thakur I, et al. Hirudotherapy in dentistry. *Int J Oral Health Sci.* 2016; 6: 65–69.
112. Поспелова МЛ, Барнаулов ОД. Влияние гирудотерапии на показатели тревоги и депрессии у пациентов с цереброваскулярной патологией. *Психофармакология и биологическая наркология.* 2006; 6(4): 1370–1375.
113. Верещак ОВ. Диференційоване застосування гірудотерапії в комплексному лікуванні алкогольної та опіоїдної залежності. [Автореф. дис. канд. мед. наук: 14.01.17.]. Харків: Академія медичних наук України Інститут неврології, психіатрії та наркології. 2007. 20 с.
114. Зубаркина ММ, Жернов ВА. Коррекция методом гирудотерапии нейропсихологических нарушений у больных истинной полицитемией. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина.* 2009; 1: 95–97.
115. Пинчук СА. Гирудотерапия при круглогодичных аллергических ринитах. *Аллергология.* 1999; 1: 36.
116. Kalender ME, et al. Leech therapy for symptomatic relief of cancer pain. *Pain Med.* 2010; 11: 443–445.
117. Dabb RW, Malonett JM. The use of leeches in the salvage of flaps with venous congestion. *Ann. Plast. Surg.* 1992; 29: 250– 256.
118. Eldor A, Orevi M, Rigbi M. The role of the leech in medical therapeutics. *Blood Reviews.* 1996; 10: 201–209.
119. Bank J, et al. Medicinal leech fixation in precarious locations. *J. Reconstr. Microsurg.* 2008; 24: 67–68.
120. Frodel J, Barth P, Wagner J. Salvage of partial facial soft tissue avulsions with medicinal leeches. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2004; 131: 934-939.

121. Hullett JS, Spinnato GG, Ziccardi V. Treatment of an ear laceration with adjunctive leech therapy: a case report. *J. Oral. Maxillofac. Surg.* 2007; 65: 2112–2114.
122. Mineo M, Jolley T, Rodriguez G. Leech therapy in penile replantation : a case of recurrent penile selfamputation. *Urology.* 2004; 63: 981–983.
123. Chepeha DB, 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.
124. Сухов КВ. Клиническая гирудотерапия: практическое руководство. М.: Accent Graphics Communications, Ottawa; 2018. 160 с.
125. Butt AM, 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.
126. 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.
127. 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.
128. Jose M, Varghese J, Babu A. Salvage of venous congestion using medicinal leeches for traumatic nasal flap. *J Maxillofac Oral Surg.* 2015; 14(1): 251-254.
129. Abdullah S, et al. Hirudotherapy / Leech therapy: applications and indications in surgery. *Arch. Clin. Exp. Surg.* 2012; 1(3): 172–180.
130. Abdulkader AM, et al. Leech therapeutic applications. *Indian. J. Pharm. Sci.* 2013; 75(2): 127-37.
131. Okka B. Hirudotherapy from past to present. *Eur. J. Basic. Med. Sci.* 2013; 3(3): 61-65.
132. Singh AP. Medicinal leech therapy (hirudotherapy): a brief overview. *Complement. Ther. in Clin. Pract.* 2010; 16: 213215.
133. Houshyar KS, Momeni A, Maan ZN. Medical leech therapy in plastic reconstructive surgery. *Wien Med Wochenschr.* 2015; 165(19-20): 419-425.

134. Koeppen D, Aurich M, Rampp T. Medicinal leech therapy in pain syndromes: a narrative review. *Wien. Med. Wochenschr.* 2014; 164 (5-6): 95-102.
135. Leech therapy for symptomatic relief of cancer pain / M. E. Kalender et al. *Pain Med.* 2010. Vol. 11. P. 443–445.
136. Пospelova MJ. Гирудотерапия пациентов с хронической головной болью и депрессией. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2017; 10-1: 56-58.
137. Pavlova IB, Yudina TG, Baskova IP. 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.
138. Тюкин ОА. Гирудотерапия: медико-социальный аспект. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2016; 9: 244-247.
139. Zulhisyam AK, et al. Local (Malaysian) Leech as Alternative Healing Treatment and an Islamic Perspective. *International Journal of Islamic Thought.* 2016; 10: 68-77.
140. Ji Y, Li L, Wu MH. Research progress in the studies on antitumor mechanisms of leech. *Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine.* 2015; 22(3): 131–133.
141. Wang Y, et al. An extract from medical leech improve the function of endothelial cells in vitro and attenuates atherosclerosis in ApoE null mice by reducing macrophages in the lesions. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2014; 455(1-2): 119–125.
142. 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.
143. Yu G, et al. Combination Effects of Antimicrobial Peptides / Antimicrob Agents *Chemother.* 2016; 60(3): 1717 - 1724.
144. Лялина ЕГ. Сочетанное применение гирудотерапии, рефлексотерапии и гомеопатии в лечении женского бесплодия. *Психосоматические и интегративные исследования.* 2016; 2: 0207.

145. Stokoz KYu, Bystritskaya TS. Leech therapy in women with a history of primary oligomenorrhea. *Амурский медицинский журнал*. 2016; 3 - 4 (15 - 16): 106-108.
146. Sayed AA, Sadeq R, Mojtaba T. Leech Therapy for Treating Priapism: Case Report Iran. *J Public Health*. 2017; 46(7): 985-988.
147. Костикова ЛИ. Гирудотерапия: энциклопедия лечения медицинскими пиявками. М.: Э, 2018. 512 с.
148. Станченко АО. Лікування рецидивуючих фурункулів носа. [Автореф. дис. канд. мед. наук: 14.01.19.]. К.: Академія медичних наук України Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка. 2004. 19 с.
149. Yudina TG, et. al. Antifungal and antibacterial functions of medicinal leech recombinant destabilase-lysozyme and its heated-up derivative. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*. 2012; 6(2): 203-209.
150. Grumbine NA, Nicholas A. Feature: reviving an ancient therapy to manage chronic pain. *Podiatry Today*. 2003; 16: 46– 53.
151. Shiffa M, et al. Leech therapy in knee osteoarthritis: mechanism and effects. *Int. J. Univers. Pharm. Life Sci*. 2012; 2(3): 40–49.
152. Фролов А, и др. Влияние гирудотерапии на физиологические показатели у коз. *Тваринництво України*. 2010; 7: 7–10.
153. Касянчук В, Іванникова О, Марченко А. Визначення субклінічного маститу у корів з використанням морфофункціональних показників вимені і математичного моделювання. *Тваринництво України*. 2009; 9: 24–28.
154. Лукоянова ЛА. Патогенетическое обоснование использования гирудотерапии при интоксикационном синдроме у собак. [Дис. канд. вет. наук: 16.00.02.]. СПб.: Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины. 2009. 130 с.
155. Попов ЛК, Долгова СА, Попова ИС. Гирудопунктура при эндометрите у собак. *Ветеринария*. 2008; 10: 55–56.
156. Лукоянова ЛА, Крячко ОВ. Влияние гирудотерапии на некоторые гематологические и биохимические показатели при интоксикационном синдроме у собак. *Ветеринарная практика*. 2009; 1 (44): 39-43.

157. 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.
158. Ayhan H, Carhan A, Mollahaliloglu S. Medical leech therapy. *International DNA day and genome congress*, april 24-28, Kirsehir, Turkey. 2017; 137.
159. Cooper JE. Veterinary surgeons and leeches. *The Veterinary Record*. 1989; 29: 117.
160. Sobczak N, Kantyka M. Hirudotherapy in veterinary medicine. *Annals of Parasitology*. 2014; 60 (2): 89-92.
161. Баскова ИП, Завалова ЛЛ. Ингибиторы протеолитических ферментов медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*) (обзор). *Биохимия*. 2001; 66(7): 869–883.
162. Каменев ОЮ. Новая технология получения биологически активной добавки из тканей медицинской пиявки для косметических и лечебных средств. *Труды Кубанского государственного аграрного университета*. 2008(10): 114–117.
163. Zavalova LL, et al. Antibacterial NonGlycosidase Activity of Invertebrate Destabilase-Lysozyme and of Its Helical. Amphipathic Peptides. *Chemotherapy*. 2006; 52: 158-160.
164. Баскова ИП, Завалова ЛЛ. Полифункциональность дестабилазы-лизоцима из медицинской пиявки. *Биоорганическая химия*. 2008; 34(3): 337–343.
165. Friedrich T, et al. An isopeptide bond splitting enzyme from *Hirudo medicinalis* similar to gammaglutamyl transpeptidase. *Eur. J. Biochem*. 1998; 256: 297–302.
166. Abbas Zaidi SM, et al. A systematic overview of the medicinal importance of sanguivorous leeches. *Altern. Med. Rev*. 2011; 16(1): 59–65.
167. Завалова ЛЛ, и др. Каталитические центры фермента дестабилазы-лизоцима медицинской пиявки (mlDL). Структурно-функциональная взаимосвязь. *Биоорганическая химия*. 2012; 38(2): 229–233.
168. Dhainaut A, Scaps P, Dhainaut A. Immune defense and biological responses induced by toxics in Annelida. *Can. J. Zool*. 2001; 79: 233– 253.
169. Жернов ВА, Зубаркина ММ. Восстановительная медицина. Гирудотерапия: уч.-метод. пособ. М.: Изд-во РУДН, 2004. 53 с.
170. Orevi M, et al. A potent inhibitor of platelet activating factor from the saliva of the leech *Hirudo medicinalis*. *Prostaglandins*. 1992; 43: 483–495.

171. 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.
172. Di Marco S, Priestle JP. Structure of the complex of leech-derived tryptase inhibitor (LDTI) with trypsin and modeling of the LDTI-tryptase system. *Structure*. 1997; 5(11): 1465–1474.
173. Hansen PR, Stawski G. Neutrophil mediated damage to isolated myocytes after anoxia and reoxygenation. *Cardiovasc. Res*. 1994; 28: 565–569.
174. Grumbine NA, Nicholas A. Feature: reviving an ancient therapy to manage chronic pain. *Podiatry Today*. 2003; 16: 46– 53.
175. Lee YC, Chiu CJ. Ocular leech infestation. *Clin Ophthalmol*. 2015; 9:419–421.
176. Баскова ИП, и др. Стероиды, гистамин и серотонин в составе секрета слюнных желез медицинской пиявки. *Биомедицинская химия*. 2008; 54(2): 127–139.
177. Baskova IP, 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.
178. Рассадина ЕВ. Экологически обоснованная биотехнология воспроизводства *Hirudo medicinalis* L. в лабораторных условиях. [Дис. кандидата биол. наук: 03.00.23, 03.00.16.]. Ульяновск: ФГОУ ВПО Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия. 2006. 199 с.
179. Фролов ОК, 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.
180. Frolov AK, 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.
181. Фролов АК, Литвиненко РА, Федотов ЕР. Анализ первичной бактериологической безопасности при гирудотерапии. Актуальні питання боротьби з інфекційними захворюваннями: науковопрактична конференція за участю

міжнародних спеціалістів, присвячена 170-й річниці з дня народження І. І. Мечникова, 14-15 травня 2015 р., м. Харків. 2015; 3.

182. Фролов ОК, та ін. Органотропність до кишечника медичної п'явки *Aegomonas hydrophyla* — бактерії-ендосимбіонту. Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки. 2012; 2: 40-46.

183. Литвиненко РО, Фролов ОК. Біотестування впливу біотехнологічної води з-під медичної п'явки виду *Hirudo verbana* на рослинні об'єкти. Нове та традиційне у дослідженнях сучасних представників медичної науки: збірник наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції, 15-16 березня 2013 року, м. Львів. 2013; 73-76.

184. Frolov A, Litvinenko R. Viability of lower crustaceans under the influence of biologically active substances of biotechnological water from the medicinal leech (*Hirudo verbana*). Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2014; 64: 313–319.

185. Запорожан М, та ін. Морфологія клітин крові лабораторних тварин і людини: Атлас. В. Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2002. 118 с.

186. Овсянников ВГ, Алексеев ВВ, Кутузова АА. Особенности лейкоцитарной реакции и фагоцитоза у крыс разного возраста при острой соматической боли. Вестник Санкт-Петербургского университета. 2008; 11(1): 44-49.

187. Бессалова ЕЮ. Показатели лейкоцитарной формулы крови белых крыс в норме и при парентеральном введении ксеногенной спинномозговой жидкости. Український журнал клінічної та лабораторної медицини. 2011; 6(3): 86-91.

188. Нурашева ЭЕ. Метаболическая и поглотительная активность нейтрофилов у молодых и старых крыс в эксперименте. Вестник КРСУ. 2015; 15(4):102-104.

189. Мельник НО, Чайковський ЮБ. Реактивні зміни органів імунного захисту за умов демієлінізації та ремієлінізації. Морфологія. 2007; 1(1): 89-93.

190. Кащенко СА, Захаров АА. Органометрические особенности строения тимуса белых крыс после иммуностимуляции и иммуносупрессии. Український журнал клінічної та лабораторної медицини. 2009; 4(3): 50-52.

191. Стручко ГЮ, и др. Морфологические изменения тимуса после применения полиоксидония. Фундаментальные исследования. 2012; 5(1): 197-202.

192. Волошин ВМ. Вивчення інгаляційного впливу епіхлоргідрину на органометричні показники тимуса в експерименті. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2012; 11(1): 35-38.
193. Бобрышева ИВ. Морфофункциональные особенности тимуса крыс различных возрастных периодов после экспериментальной иммуносупрессии. Вестник ВГМУ. 2014; 13(1): 48-55.
194. Бобрышева ИВ. Морфофункціональні особливості тимуса щурів різних вікових періодів у нормі та після експериментальної імуностимуляції. Morphologia. 2013; 7(4): 11-17.
195. Румянцева ЛС. Морфология тимуса белых крыс в постнатальном онтогенезе. Материалы первой научной конференции молодых учёных-морфологов Москвы. Москва, 1976; 61-64.
196. Юрина НА, Румянцева ЛС. Особенности микро-и ультраструктуры тимуса и его реактивности в постнатальном онтогенезе. Физиология, морфология и патология тимуса: сб. научн. трудов. Москва, 1986; 4-7.
197. Boehm T. Thymus development and function. Cur. Opin. Immun. 2008; 20(2): 178-184.
198. Пасюк АА, Пивченко ПГ. Характеристика кровеносного русла тимуса белой крысы в эмбриогенезе. Вестник ВГМУ. 2006; 5(3): 1-6.
199. Жолобов ЛР. Форма и размеры вилочковой железы в различные возрастные периоды. Архив анат. 1959; 36(6): 68–71.
200. Западнюк ИП, и др. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. 3-е изд. Киев: Вища школа, 1983. С. 254.
201. Ноздрачев АД, Поляков ЕЛ. Анатомия крысы (лабораторные животные). СПб.: Лань, 2001. 464 с.
202. Петренко ВМ. Анатомия тимуса у белой крысы. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2012; 8: 10-13.
203. Пугач ПВ. Влияние длительности этаноловой интоксикации на крыс и иммунные органы их потомства (экспериментально-морфологическое

- исследование). [Автореф. дис. д-ра мед. наук: 14.03.01.]. СПб.: Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия. 2012. 45 с.
204. Забродин ВА. Морфология тимуса взрослого человека. [Автореф. дис. д. мед. наук: 14.00.02.]. Москва, 2004. 40 с.
205. Пасюк АА, Пивченко ПГ. Эмбриогенез тимуса человека и белой крысы. Актуальные вопросы морфологии. 2008; 2008: 91–92.
206. Константинов ВМ, Наумов СП. Зоология позвоночных. М.: Академия, 2011. 448 с.
207. Петренко ВМ. О морфогенезе долей тимуса у плодов белой крысы. Успехи современного естествознания. 2012; 11: 35-37.
208. Пасюк АА. Вилочковая железа белой крысы в постнатальном онтогенезе. Медицинский журнал. 2006; 1(15): 71-73.
209. Пасюк АА, Артишевский АА. Динамика роста тимуса белой крысы в пренатальном онтогенезе. Актуальные проблемы медицины: сборник научных статей Республиканской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 25 основания учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет», 5–6 ноября 2015 года, г. Гомель. 2015; 765-767.
210. Сапин МР, Никитюк ДБ. Иммунная система, стресс и иммунодефицит. М.: АПП Джангар. 2000. 184 с.
211. Хаитов РМ. Физиология иммунной системы. Рос. физиол. журнал им. И. М. Сеченова. 2000; 86(3): 252–256.
212. Шапкин ЮГ, Масляков ВВ. Селезенка и иммунный статус организма. Вестник хирургии. 2009; 168(2): 110–113.
213. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. Nat. Rev. Immunol. 2005; 5: 606–616.
214. Арлашкина ОМ, и др. Морфофункциональное состояние селезенки потомства спленэктомированных крыс-самок. Цитоморфометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты: материалы V Всероссийской научно-практической конференции. Москва, 2012; 96-97.

215. Сарыева ОП. Морфология тимуса, селезенки, надпочечников и особенности физического развития крыс под влиянием гуминовых соединений. [Дис. канд. мед. наук: 03.00.25.]. Москва: Научно-исследовательский институт морфологии человека РАМН. 2006. 145 с.
216. Стручко ГЮ, и др. Морфофункциональные изменения селезенки и тимуса крысят, родившихся от спленэктомированных крыс-самок. Успехи современного естествознания. 2014; 9: 70—72.
217. Михайлова МН, и др. Участие дендритных и нейроэндокринных клеток тимуса в развитии его инволюции при формировании экспериментальной опухоли толстой кишки. Вестник Чувашского госуниверситета. 2011; 3: 377-383.
218. Драндрова ЕГ, Стручко ГЮ, Михайлова МН. Влияние иммунодефицитной беременности на противоопухолевый иммунитет потомства. Успехи современного естествознания. 2013; 9: 84-86.
219. Быков ВЛ. Частная гистология человека. СПб.: Сотис, 1999. 300 с
220. Balogh P, Horvath G, Szakal AK. Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen . J. Histochem. Cytochem. 2004; 52(1287): 98.
221. Кащенко СА, и др. Строение селезенки белых крыс подсосного возраста / Таврический медико - биологический вестник. 2013; 16 (61): 104-106.
222. Иллек ЯЮ, и др. Имунофан в комплексном лечении детей с аллергическим диатезом. Педиатрия. 1999; 4: 71—73.
223. Афанасьева МА. Развитие иммунной системы в онтогенезе крыс: нейроэндокринно-иммунные взаимодействия. [Автореф. дис. канд. биол. наук: 03.00.13.]. М.: Институт биологии развития ИМ. Н. К. Кольцова РАН. 2009. 22 с.
224. Капитонова МЮ, и др. Возрастная гистофизиология белой пульпы селезенки в раннем постнатальном онтогенезе. Успехи современного естествознания. 2008; 1: 57—58.
225. Овчаренко ВВ. Будова селезінки інтактних щурів різних вікових груп. Український медичний альманах. 2012; 15 (1): 189-192.

226. 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.
227. Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження». URL: <http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/3447-15>.
228. Фролов ОК. Методичні рекомендації до технологічного регламенту біотехнології медичної п'явки. Запоріжжя : Сору Art, 2012. 36 с.
229. Амінов РФ, Фролов ОК, Федотов ЄР, винахідники; Запорізький національний університет, патентовласник. Пристрій для фіксації дрібних лабораторних тварин. Патент Україна на корисну модель. № u 201512710. 2016 травень 25.
230. 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.
231. Фролов О К, Федотов Є Р, Копійка В В, Литвиненко РО, винахідники; Запорізький державний університет, патентовласник. Спосіб отримання антигенів із медичної п'явки. Патент Україна на корисну модель. № u 201213751. 2013 червень 10.
232. Хиггинс К. Расшифровка клинических лабораторных анализов. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2017. 592 с.
233. Фримель Г. Иммунологические методы; пер. с англ. М.: Медицина, 1987. 472 с.
234. Кайдашева ІП. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині. Полтава : Полімет, 2003. 320 с.
235. Назаренко ГИ, Кишкун АА. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. М.: Медицина, 2000. 544 с.
236. Блиндарь В, Зубрихина Г, Матвеева И, Кушлинский Н. Гематологические методы исследования. Клиническое значение показателей крови. Руководство для врачей. М.: Медицинское информационное агентство, 2013. 96 С.

237. Меньшиков ВВ. Клиническая лабораторная аналитика. Том II. Частные аналитические технологии в клинической лаборатории. М.: Лабиринформ-РАМЛД, 1999. 352 с.
238. Золотарев АГ, Пименов ЕВ, Девришов ДА. Световая микроскопия микроорганизмов. Практическое руководство: монография. М.: Агровет, 2013. 287 с.
239. Коржевский ДЭ, Гиляров АВ. Основы гистологической техники. СПб. : СпецЛит., 2010. 95 с.
240. 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.
241. Луговская СА, Почтарь МЕ. Гематологический атлас. 2-е изд., испр. и доп. М.: Триада, 2008. 296 с.
242. Амінов РФ, Фролов О К, Федотов Є Р, винахідники; Запорізький національний університет, патентовласник. Спосіб визначення фагоцитарної активності нейтрофілів. Патент Україна на винахід. № а 201604503. 2018 квітень 10.
243. Лакин ГФ. Биометрия. Монография. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
244. Dunn OJ. Basic statistics: a primer for the biomedical sciences [4th ed.]. NY : John Wiley & Sons, 2009. 272 p.
245. Катеренчук, ІІ. Клінічне тлумачення й діагностичне значення лабораторних показників у загальнолікарській практиці : навч. посіб. К.: Медкнига, 2015. 223 с.
246. Козинец ГИ, Высоцкий ВВ. Кровь М.: Практическая Медицина, 2014. 208
247. Романько МЄ. Рівень показників імунної реактивності у крові щурів за умов одноразового внутрішньошлункового введення суміші наночастинок металів (АG, FE, CU, Двоокис MN) 2017; 9(5-6): 1 -18.
248. Михайлова МН. Морфофункциональные изменения тимуса и показатели крови после введения циклофосфана, имунофана и их комбинации. [Дис. канд. мед. наук: 03.00.25.]. Чебоксари: Чувашский государственный університет им. И. Н. Ульянова. 2004. 118 с.
249. Пирс Г, Кащенко СА, Захаров. АА. Нормальна структура, функція і гістологія тимусу. Український морфологічний альманах. 2011; 9(3): 4-8.

250. Кварацхелия АГ, и др. Морфологическая характеристика тимуса и селезенки при воздействии факторов различного происхождения. Журнал анатомии и гистопатологии. 2016; 5(3): 77-83.
251. Кузнецова ЛВ, Бабаджан ВД, Харченко НВ. Імунологія: підручник. Вінниця: ТОВ Меркьюрі Поділля, 2013. 564 с.
252. Біловола ОМ, та ін. Клінічна імунологія та алергологія: навчальний посібник. Х.: Гриф, 2011. 550 с.
253. Сбойчаков ВБ, и др. Основы микробиологии и иммунологии : учебник. Москва : КноРус, 2017. 273 с.
254. Матвеева ОВ, та ін. До питання класифікації побічних реакцій лікарських засобів та підходів до їх диференціації (бібліографічний огляд). Укр. мед. часопис. 2011; 2 (82): 78-84.
255. Солошенко ЭН. Лекарственная болезнь в проблеме побочного действия лекарственных средств: современное состояние. Дискуссионные вопросы диагностики и лечения. Международный медицинский журнал. 2012; 3: 80-88.
256. Фролов ОК, Амінов РФ, Даниленко Ю. Гематологічно-морфометричні зміни показників у щурів на фоні впливу сольового екстракту *Hirudo verbena*. Актуальні питання біології, екології та хімії». 2018; 15(1): 118-126
257. Амінов РФ, Фролов ОК, Федотов ЄР. Морфометричні параметри тіла та імунологічних органів щурів на ранніх етапах постембріонального розвитку на фоні гірудовпливу *Hirudo verbana* в передембріональний і ембріональний періоди розвитку. Вісник Запорізького національного університету: збірник наукових праць. Біологічні науки. 2017; 1: 71-77.
258. Амінов РФ, Фролов ОК. 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.
259. Амінов РФ, Фролов ОК, Федотов ЄР, Макєєва ЛВ. 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.

260. Амінов РФ, Фролов ОК. Проліферативна активність клітин кісткового мозку щурів за впливу біологічно активних речовин медичної п'явки. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2017; 8 (4): 501-505..

261. Aminov RF, Frolov AK. Influence of ectoparasite - *Hirudo verbana* on morphogenetic reactions of the host organism – *rattus*. *Current trends in immunology*. 2017; 18: 107-117.

262. Aminov RF, Frolov AK. The impact of fetal load of *Hirudo verbana* saline extract antigens morphometrical, hematological and immunological parameters of rats in the early stages of post-embryonic development. *Annals of parasitology*. 2018; 64(1): 13-20.

263. Аминов РФ, Фролов АК, Федотов ЕР. 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.

264. Бабаева АГ, Геворкян НМ, Зотиков ЕА Роль лимфоцитов в оперативном изменении программы развития тканей. М.: РАМН. 2009. 108 с.

265. Волошин МА, 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.

266. Ушакова АВ. Доброкачественные заболевания щитовидной железы. Клиническая классификация. М.: Клиника доктора А.В. Ушакова, 2013. 384 с.

267. Papi G, Livolsi VA. Current Concepts on Riedel Thyroiditis. *Am. J. Clin. Pathol*. 2004; 121(1): 50-63.

268. Sell S. Alpha-Fetoprotein (AFP), Stem Cells, and Cancer: How Study of the Production of AFP During Chemical Hepatocarcinogenesis Led to Reaffirmation of the Stem Cell Theory of Cancer. *Tumor Biol*. 2008; 29(3): 161–180.

269. Шишкина ВВ, Воронцова ЗА. Частный случай проявления морфогенетической активности лимфоцитов в эксперименте. Вестник новых медицинских технологий. 2013; 10(2): 318.
270. Бабаева АГ. Регенерация: факты и перспективы. М.: РАМН, 2009. 336 с.
271. Белан ЕИ. Способность клеток перитонеального экссудата запускать различные механизмы эритроидной дифференцировки на различных сроках после массивной кровопотери у мышей. Бюл.экспер.биол. 2000; 129(5): 521–524.
272. Арташян ОС, Храмцова ЮС, Юшков БГ. Участие тучных клеток в процессе репаративной регенерации щитовидной железы. Вестник уральской медицинской академической науки. 2013; 2: 36.
273. Храмцова ЮС. Роль иммунной системы в регуляции регенерации тканей с разной восстановительной способностью. [Дис. канд. биол. наук: 03.00.13.]. Екатеринбург: Уральский государственный университет им. А.М. Горького. 2004. 184с.
274. Долгушин ИИ, Бухарин ОВ. Нейтрофилы и гомеостаз. Екатеринбург: УрО РАН, 2001. 713с.
275. Черешнев ВА, и др. Иммунофизиология Екатеринбург: УрО РАН, 2002. 260с.
276. Черешнева МВ, Шилов ЮИ, Баданина ОН. Иммунокоррекция при ранении глаза. Екатеринбург: УрО РАН, 2001. 147с.
277. Тугушев АС, Петренко АЮ, Избицкий В. В. Стволовые клетки и цирроз печени. Патологія. 2010; 7: 1: 4-7.
278. Храмцова ЮС, Арташян ОС, Юшков БГ. Морфогенетическая функция иммунокомпетентных клеток при репаративной регенерации тканей с разной восстановительной способностью. Таврический медико-биологический вестник. 2012; 3(59): 372-375.
279. Chujo S, et al. Connective tissue growth factor causes persistent proalpha 2(I) collagen gene expression induced by transforming growth factorbeta in a mouse fibrosis model. J. Cell Physiol. 2005; 203(2): 447 – 456.
280. Фролов АК, Аминов РФ, Фролова ЛА, Литвиненко РА, Федотов ЕР. К вопросу о морфогенетической функции иммунной системы. Науково–практична конференція

з міжнародною участю «Нові досягнення в імунології та алергології», 15–16 вересня 2017 р., м. Київ. 2017; 53-54.

281. Аминов РФ. Морфометрические параметры тела и иммунологических органов на фоне гирудовлияния. Материалы IV Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Наука и медицина: современный взгляд молодежи», 20-21 апреля 2017 г., г. Алматы, Республика Казахстан. 2017; 664.

282. Амінов РФ. Фролов ОК. Морфометричні, гематологічні та імунологічні показники крові щурів на фоні гірудовпливу. Матеріали XV Всеукраїнської наукової конференції з очно-заочною участю «Актуальні питання біології та медицини», 25 – 26 травня 2017 р., м. Старобільськ. 2017; 192.

283. Амінов РФ, Фролов ОК. Вплив слини медичної п'явки на розміри селезінки в різні періоди раннього постембріонального розвитку щура. Науково-практична конференція “Прикладні аспекти морфології”, присвяченій пам’яті професорів-морфологів Терентьєва Г.В., Роменського О.Ю., Когана Б.Й., Шапаренка П.П., Жученка С.П., 21-22 верес. 2017 р., м. Вінниця. 2017; 31-32.

284. Амінов РФ, Даниленко ІЮ. Вплив антигенів медичної п'явки на морфометричні показники тіла приплоду щурів у динаміці онтогенезу. Матеріали IV Регіональної науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих учених «Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих, медичних та фармацевтичних наук» з всеукраїнською участю», 27 листопада 2015 р., м. Запоріжжя. 2015; 264.

285. Амінов РФ, Даниленко ІЮ. Вплив антигенів медичної п'явки на зовнішні та внутрішні морфометричні показники щурів на ранніх етапах постембріонального розвитку. Матеріали IX університетської науково-практичної конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Молода наука - 2016», 12-14 квітня, 2016 р., м. Запоріжжя. 2016; 297.

286. Аминов РФ. Внутриутробная нагрузка соевым экстрактом *hirudo verbana* на иммунологические показатели крыс в ранних этапах постэмбрионального развития. Материалы LXXI Международной научно-практической конференции студентов и

молодых учёных «Актуальные проблемы современной медицины и фармации - 2017», 17-19 апреля 2017 г., г. Республика Беларусь. 2017; 733.

287. Аминов РФ. Цитологические показатели крыс на ранних этапах постэмбрионального развития под влиянием внутриутробной нагрузки биологически активными веществами солевого экстракта *Hirudo verbana*. Материалы LXXI Международной научно-практической конференции студентов и молодых учёных «Актуальные проблемы современной медицины и фармации - 2017», 17-19 апреля 2017 г., г. Минск, Республика Беларусь. 2017; 393.

288. Амінов РФ, Фролов ОК, Федотов ЄР. Гематологічний аналіз крові щурів на ранніх етапах постембріонального розвитку на фоні впливу *Hirudo verbana* в преембріональний і ембріональний періоди розвитку. Матеріали V Міжнародної науково-практичної конференції Присвяченої 30-річчю біологічного факультету Запорізького національного університету «Сучасні проблеми біології, екології та хімії», 26-28 квітня 2017 р., м. Запоріжжя. 2017; 336.

289. 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.

290. Wu R, Van der Hoek KH, Ryan NK, Norman RJ, Robker RL. Macrophage contributions to ovarian function. Human Reproduction Update. 2004; 10(2): 119-133.

291. Бабаева АГ. Еще раз о морфогенетической, или строительной функции лимфоцитов. Вестник российской академии естественных наук. 2010; 4: 70–74.

292. Геворкян НМ, Бабаева АГ. Вариабельность проявлений морфогенетической функции лимфоцитов в зависимости от характера и локализации поврежденного органа. Вестник российской академии естественных наук. 2012; 1: 44–47.

293. Фролов АК, и др. Популяционные и субпопуляционные сдвиги лейкоцитов крови под влиянием биологически активных веществ медицинской пиявки. Імунологія та алергологія: наука і практика. 2011; 1: 43.

294. Фролов АК, Литвиненко РА, Фролова ЛА, Макеева ЛВ, Федотов ЄР. Динамика гомеостатической активации Т-лимфоцитов и натуральных киллеров

крови человека после экстракорпоральной краткосрочной голодовой инкубации клеток. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2014; 1: 63-70.

295. Фролов АК, Литвиненко РА, и др. К механизму иммуотропного действия гирудотерапии. Імунологія та алергологія: наука і практика. 2010; 3-4: 32-34.

296. Фролов ОК, Копійка ВВ, Федотов ЄР, Литвиненко РО. Вплив біологічно активних речовин медичної п'явки на ізольовані зразки крові під час гірудотерапії. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2010; 3 (51): 36-40.

297. Фролов АК, Копейка ВВ, Федотов ЕР. Особенности реакции бластной трансформации лимфоцитов крови доноров стимулированной растительными лектинами и антигенами кольцецов. Проблеми екології та медицини. 2012; 16(5-6): 37-40.

298. Пинегин БВ, Хаитов РМ, Некрасов АВ, Пучкова НГ, Иванова АС. Полиоксидоний препарат нового поколения иммуномодуляторов с известной структурой и механизмом Иммунология. 2000; 5: 24-28.

299. Зайчик АШ, Чурилов ЛП. Аутоиммунитет как система физиологической регуляции морфофункциональных процессов. Клиническая патофизиология. 2002; 2: 8–17.

300. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. Science. 2010; 327: 291–295.

301. Zaichik ASh, Churilov LP, Utekhin VJ. Autoimmune regulation of genetically determined cell functions in health and disease. Pathophysiology. 2008; 15(3): 191–207.

302. Полетаев АБ. Физиологическая иммунология: естественные аутоантитела и проблемы наномедицины. М.: Миклош, 2010. 218 с.

303. Зайчик АМ, Полетаев АБ, Чурилов ЛП. Распознавание «своего» и взаимодействие со «своим» как основная форма активности адаптивной иммунной системы. Вестник СПбГУ. 2013; 1: 7-16.

304. Полетаев АБ, Арапов НА. О перспективах развития новой концепции профилактической медицины. Вестник международной академии наук (Русская секция). 2006; 2: 5-10.

305. Храмова ЮС, Тюменцева НВ, Янович СВ. Репаративная регенерация семенника при различных функциональных состояниях иммунной системы. Вестник Уральской медицинской академической науки. 2011; 2–1(35) : 71-72.
306. Амінов РФ. Метаболічна активність нейтрофілів щурів на ранніх етапах постембріонального розвитку на фоні гірудовпливу. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю, присвячена дню науки «Сучасні аспекти медицини і фармації - 2017», 11-12 трав. 2017 р., м.Запоріжжя. 2017; 191.
307. Амінов РФ. Фролов ОК. Фагоцитарна активність нейтрофілів крові щура на фоні гірудотерапії. Матеріали IV Міжнародної наукової конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології», 5-6 жовтня 2017 р., м. Дніпро. 2017; 270.
308. Амінов РФ. Фагоцитарна активність нейтрофілів крові щурів під впливом сольового екстракту *Hirudo verbana*. Матеріали V Регіональної науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих учених «Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих, медичних та фармацевтичних наук», 26 листопада, 2016 р., м. Запоріжжя. 2016; 114.
309. Хаитов РМ, Пашенков МВ, Пинегин БВ. Роль паттернраспознающих рецепторов во врождённом и адаптивном иммунитете. Иммунология. 2009; 1: 66-76.
310. Лебедев КА, Понякина ИД. Иммунология образраспознающих рецепторов (интегральная иммунология). М. : ЛИБРОКОМ, 2009. 256 с.
311. Дранник ГН. Клиническая иммунология и аллергология: пособ. для студ., врачей-интернов, иммунологов, аллергологов, врачей лечебного профиля всех спец. 5-е изд., доп. К.: Полиграфплюс, 2011. 561 с.
312. Aminov RF, Frolov OK. Functional state of t-lymphocyte rats in vitro under the influence of biologically active substances of salives of *Hirudo verbana* in vivo. Матеріали III Міжнародної наукової конференції «Мікробіологія і іммунологія – перспективи розвитку в ХХІ столітті», 19-20 квітня, 2018 р., м. Київ. 2018; 123.

313. Frolov AK, Aminov RF, Fedotov YeR, Litvinenko RA. Methodology for morphogenetic function of immunity. Материалы III Международной научной конференции «Микробиология и иммунология – перспективы развития в XXI веке», 19-20 апреля 2018 г., г. Киев. 2018; 132.

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

*Статті у наукових фахових виданнях України, які входять
до міжнародних наукометричних баз*

1. Амінов РФ, Фролов ОК, Федотов ЄР. Морфометричні параметри тіла та імунологічних органів щурів на ранніх етапах постембріонального розвитку на фоні гірудовпливу *Hirudo verbana* в передембріональний і ембріональний періоди розвитку. Вісник Запорізького національного університету: збірник наукових праць. Біологічні науки. 2017; 1: 71-77. (Index Copernicus) *(Здобувачем особисто виконано дослідження, взята участь у аналізі результатів та написанні статті).*

2. Амінов РФ, Фролов ОК. 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. (Web of Science) *(Здобувачем особисто виконано експериментальні дослідження, аналіз та статистичну обробку результатів, написання статті).*

3. Амінов РФ, Фролов ОК, Федотов ЄР, Макєєва ЛВ. 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. (Index Copernicus) *(Здобувачем особисто виконано експериментальні дослідження, аналіз та статистичну обробку результатів, написання статті).*

4. Амінов РФ, Фролов ОК. Проліферативна активність клітин кісткового мозку щурів за впливу біологічно активних речовин медичної п'явки. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2017; 8 (4): 501-505. (Web of Science) *(Здобувачем*

особисто виконано експериментальні дослідження, взята участь у морфологічних дослідженнях, здійснено аналіз результатів дослідження, написання статті).

*Статті у наукових зарубіжних виданнях, які входять
до міжнародної наукометричної бази SCOPUS:*

1. Aminov RF, Frolov AK. Influence of ectoparasite - Hirudo verbana on morphogenetic reactions of the host organism – rattus. Current trends in immunology. 2017; 18: 107-117. (SCOPUS) *(Здобувачем особисто виконано експериментальні дослідження, взята участь у морфологічних дослідженнях, здійснено аналіз та статистичну обробку результатів, написання статті).*

2. Aminov RF, Frolov AK. The impact of fetal load of Hirudo verbana saline extract antigens morphometrical, hematological and immunological parameters of rats in the early stages of post-embryonic development. Annals of parasitology. 2018; 64(1): 13-20. (SCOPUS) *(Здобувачем особисто виконано експериментальні дослідження, аналіз та статистичну обробку результатів, написання статті).*

Статті у наукових зарубіжних виданнях

1. Аминов РФ, Фролов АК, Федотов ЕР. Влияние внутриутробной нагрузки биологически активными веществами солевого экстракта Hirudo verbana на морфометрические и гематологические показатели крыс на ранних этапах постэмбрионального развития. Иммунопатология, Аллергология, Инфектология. 2016; 4: 6-11. *(Здобувачем особисто виконано експериментальні дослідження, взята участь у морфологічних дослідженнях, здійснено аналіз та статистичну обробку результатів, написання статті).*

Статті у інших наукових виданнях України

1. Фролов ОК, Амінов РФ, Даниленко Ю. Гематологічно-морфометричні зміни показників у щурів на фоні впливу сольового екстракту *Hirudo verbena*. Актуальні питання біології, екології та хімії». 2018; 15(1): 118-126. *(Здобувачем особисто виконано експериментальні дослідження, аналіз та статистичну обробку результатів, написання статті).*

Тези наукових доповідей:

1. Аминов РФ. Морфометрические параметры тела и иммунологических органов на фоне гирудовлияния. Материалы IV Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Наука и медицина: современный взгляд молодежи», 20-21 апреля 2017 г., г. Алматы, Республика Казахстан. 2017; 664.

2. Амінов РФ. Метаболічна активність нейтрофілів щурів на ранніх етапах постембріонального розвитку на фоні гірудовпливу. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю, присвячена дню науки «Сучасні аспекти медицини і фармації - 2017», 11-12 трав. 2017 р., м.Запоріжжя. 2017; 191.

3. Амінов РФ. Фролов ОК. Фагоцитарна активність нейтрофілів крові щура на фоні гірудотерапії. Матеріали IV Міжнародної наукової конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології», 5-6 жовтня 2017 р., м. Дніпро. 2017; 270.

4. Амінов РФ. Фролов ОК. Морфометричні, гематологічні та імунологічні показники крові щурів на фоні гірудовпливу. Матеріали XV Всеукраїнської наукової конференції з очно-заочною участю «Актуальні питання біології та медицини», 25 – 26 травня 2017 р., м. Старобільськ. 2017; 192.

5. Амінов РФ, Фролов ОК. Гірудологічний вплив на мітотичну активність клітин кісткового мозку щурів. Матеріали Всеукраїнської наукової конференції з

дистанційною участю «Актуальні питання біології та медицини», 16-17 листопада 2017 р., м. Суми. 2017; 13.

6. Амінов РФ, Фролов ОК. Вплив слини медичної п'явки на розміри селезінки в різні періоди раннього постембріонального розвитку щура. Науково-практична конференція “Прикладні аспекти морфології”, присвяченій пам'яті професорів-морфологів Терентьєва Г.В., Роменського О.Ю., Когана Б.Й., Шапаренка П.П., Жученка С.П., 21-22 верес. 2017 р., м. Вінниця. 2017; 31-32.

7. Амінов РФ, Фролов ОК, Федотов ЄР. Гематологічний аналіз крові щурів на ранніх етапах постембріонального розвитку на фоні впливу *Hirudo verbana* в преембріональний і ембріональний періоди розвитку. Матеріали V Міжнародної науково-практичної конференції Присвяченої 30-річчю біологічного факультету Запорізького національного університету «Сучасні проблеми біології, екології та хімії», 26-28 квітня 2017 р., м. Запоріжжя. 2017; 336.

8. Амінов РФ, Даниленко ІЮ. Вплив антигенів медичної п'явки на морфометричні показники тіла приплоду щурів у динаміці онтогенезу. Матеріали IV Регіональної науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих учених «Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих, медичних та фармацевтичних наук» з всеукраїнською участю», 27 листопада 2015 р., м. Запоріжжя. 2015; 264.

9. Амінов РФ, Даниленко ІЮ. Гематологічні показники щурів на ранніх етапах постембріонального розвитку при імуностимуляції біологічно активними речовинами медичної п'явки в преембріональний і ембріональний період. Матеріали ІХ університетської науково-практичної конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Молода наука-2016», 12-14 квітня 2016 р., м. Запоріжжя. 2016; 398.

10. Амінов РФ. Фагоцитарна активність нейтрофілів крові щурів під впливом сольового екстракту *Hirudo verbana*. Матеріали V Регіональної науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих учених «Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих, медичних та фармацевтичних наук», 26 листопада, 2016 р., м. Запоріжжя. 2016; 114.

11. Аминов РФ. Внутриутробная нагрузка солевым экстрактом *hirudo verbana* на иммунологические показатели крыс в ранних этапах постэмбрионального развития. Материалы LXXI Международной научно-практической конференции студентов и молодых учёных «Актуальные проблемы современной медицины и фармации - 2017», 17-19 апреля 2017 г., г. Республика Беларусь. 2017; 733.

12. Фролов АК, Аминов РФ, Фролова ЛА, Литвиненко РА, Федотов ЕР. К вопросу о морфогенетической функции иммунной системы. Науково–практична конференція з міжнародною участю «Нові досягнення в імунології та алергології», 15–16 вересня 2017 р., м. Київ. 2017; 53-54.

13. Аминов РФ, Фролов АК, Федотов ЕР. Морфометрические, гематологические и мунологические показатели крыс в ранних этапах постэмбрионального развития на фоне внутриутробного влияния биологически активными веществами слюны и солевого экстракта *Hirudo verbana*. Материалы Второго Симпозиума Международной Ассоциации Гирудотерапевтов и Гирудологов, 1 – 3 сентября 2017 г., г. Святи Влас, Болгария. 2017; 94-101.

14. Aminov RF, Frolov OK. Functional state of t-lymphocyte rats *in vitro* under the influence of biologically active substances of salives of *Hirudo verbana* in vivo. Материалы III Международной научной конференции «Микробиология и иммунология – перспективы развития в XXI веке», 19-20 апреля, 2018 г., г. Киев. 2018; 123.

Патенти:

1. Амінов РФ, Фролов ОК, Федотов ЄР, винахідники; Запорізький національний університет, патентовласник. Пристрій для фіксації дрібних лабораторних тварин. Патент Україна на корисну модель. № u 201512710. 2016 травень 25. (Здобувачем особисто проведено патентні дослідження, написання патенту, взята участь у формулюванні формули винаходу).

2. Амінов РФ, Фролов ОК, Федотов ЄР, винахідники; Запорізький національний університет, патентовласник. Спосіб визначення фагоцитарної

активності нейтрофілів. Патент Україна на винахід. № а 201604503. 2018 квітень 10.
(Здобувачем особисто проведено патентні дослідження, написання патенту, взята участь у формулюванні формули винаходу).