



УДК 595.143.6:612.112.31+599. 323.4

Фагоцитарна та метаболічна активність нейтрофілів щурів на ранніх етапах постембріонального розвитку за впливу біологічно активних речовин сольового екстракту *Hirudo verbana*

Р.Ф. Амінов, О.К. Фролов

Запорізький національний університет, Запоріжжя, Україна

Тест із нітросинім тетразолієм показує ступінь активації кисневозалежних механізмів бактерицидності фагоцитуючих клітин, тому підвищення НСТ тестів та фагоцитарних показників свідчить про підвищену активацію до бактеріального процесу та підвищений захист за допомогою поглинальної здатності клітин в організмі. Вивчали дозований вплив біологічно активних речовин медичної п'явки (*Hirudo verbana* Cagena, 1820) на клітинну ланку природженого імунітету самок нелінійних щурів після вигодовування приплоду, яким за два тижні до і два тижні після парування вводили внутрішньочеревно антигени сольового екстракту медичної п'явки (4 ін'єкції) та сам приплод у динаміці на 1, 15, 30, 45, 60-ту добу. Фіксували тварин за допомогою фіксувального пристрою. Тварин розподіляли на три групи: перша експериментальна група тварин за впливу антигенів сольового екстракту медичної п'явки у кількості 0,5 мл (із розрахунку 3 мкг/г маси тварини); друга інтактна група тварин без втручань, третя контрольна група тварин, яким внутрішньочеревно вводили фізіологічний розчин (0,5 мл). Усіх тварин декапітували під ефірним наркозом. Після чого брали кров, розводили кристалічним гепарином та досліджували лабораторні показники: загальну кількість лейкоцитів і лейкоцитарну формулу. Показники неспецифічної резистентності організму досліджували за допомогою тестів, що характеризують активність нейтрофілів (НСТ-тест, показники фагоцитозу). Виявлено позитивний вплив антигенів сольового екстракту медичної п'явки на поглинальну та метаболічну активність нейтрофілів у самок та її приплоду на всіх термінах дослідження, який проявлявся збільшенням фагоцитарного індексу та числа, збільшенням спонтанного та стимульованого тестів на відновлення нітросинього тетразолу порівняно з контролем, збільшенням кількості лейкоцитів за рахунок зміни процесу диференціації та депонування клітин в імунотенних органах на проліферацію. Зміни імунологічних показників свідчать про імуностимулювальний вплив антигенів медичної п'явки на лейкопоез та функціональну активність нейтрофілів – першу лінію захисту від проникнення в організм різних бактерій, грибів і найпростіших.

Ключові слова: фагоцитоз; біологічно активні речовини; п'явка; кров; лейкоцити; антигени

Phagocytic and metabolic activity of neutrophils of rats in the early stages of post-embryonic development under the influence of biologically active substances of the salt extract of *Hirudo verbana*

R.F. Aminov, A.K. Frolov

Zaporizhzhia National University, Zaporizhzhia, Ukraine

The nitroblue tetrazolium test reflects the degree of activation of oxygen-dependent mechanisms of bactericidal activity of phagocytotic cells, so the increase in nbt-test and phagocytic indices shows increased activation in the bacterial process and enhanced protection with the help of the absorption ability of the cells in the body. We examined females of nonlinear rats after feeding of their offspring, which 2 weeks before and 2 weeks after mating were injected intraperitoneally with antigens of saline extract of medical leeches (4 injections) and the offspring at days 1, 15, 30, 45, 60. The dosage of salt extract antigens was carried out by determining the protein concentrations using the Lowry protein assay. The animals were immobilized using an immobilizing device. The animals were distributed into three groups: the first research and experimental group of animals was subject to the influence of medical leech salt extract antigens to the amount of 0.5 ml (at the rate of 3 µg/g of animal weight); the second group of intact animals was not subject to intervention, the third control group of animals was

Запорізький національний університет, вул. Жуковського, 66, Запоріжжя, 69600, Україна
Zaporizhzhia National University, Zhukovsky Str., 66, Zaporizhzhia, 69600, Ukraine
Tel.: +38-067-479-65-91. E-mail: 91_amin_91@mail.ru; a_frolov@ukr.net

administered intraperitoneally saline 0.5 ml of 9% saline solution. We studied females after feeding offspring and offspring at 1, 15, 30, 60 days. The animals were kept in vivarium conditions in individual cages on a standard diet. In the experiment we used 60 females of non-linear rats and 300 of their offspring. All animals were decapitated under ether anesthesia. After that, we took blood, made a solution with crystal heparin and examined the laboratory parameters: total number of leukocytes and leukocyte formula. Evaluation of nonspecific resistance of the organism was investigated using tests which characterize the activity of neutrophils (nbt-test, phagocytosis indices). The results of our studies revealed a positive effect of antigens of saline extract of medical leeches on the absorptive and metabolic activity of neutrophils in the females and their offspring in all study periods compared with the control, an increased number of leukocytes, due to the change of the process of differentiation and deposition of cells in immunogenic organs on proliferation. Changes in immunological parameters indicate the immunostimulatory effect of AG ML on leukopoiesis and on the functional activity of neutrophils – the first line of defense against entry into the body of a variety of bacteria, fungi and protozoa.

Keywords: phagocytosis; bioactive substances; medical leech; blood; leukocytes; antigens

Вступ

Використання медичних п'явок у гірудотерапії зумовлене широким спектром їх терапевтичної дії: регуляція гемостазу та судинного тону, протизапальна, регенераційна, нейротропна, бактериостатична, імунотерапевтична та ін. (Kamenev and Baranovski, 2006; Hildebrandt and Lemke, 2011). Згідно з електрофоретичними даними, у слині медичної п'явки виявлено понад 100 біологічно активних речовин (БАР) (Zharov, 2003; Gerashhenko, 2007), які є антигенами для людини. Тому БАР певним чином впливають на імунну систему. Секрет слинних залоз медичної п'явки стимулює фагоцитарну активність нейтрофілів (ФАН) та антикомплементарну активність секрету (Savinov, 2004).

Оригінальні дослідження присвячені вивченню впливу гірудотерапії на функціональну активність макрофагів при захворюваннях, що супроводжуються вторинними імунодефіцитними станами (наприклад синдром психоемоційного вигорання), показали, що гірудотерапія забезпечує активацію попередньо знижених фагоцитарних показників моноцитів або макрофагів до нижньої межі норми та підвищення функціональної активності системи фагоцитуючих макрофагів. Гірудотерапія відіграє важливу роль у лікуванні остеоартриту та ревматоїдного артриту (Abdullah et al., 2012), гіпертонічної хвороби (Isahanjan and Arutjunjan, 1991), цереброваскулярних захворювань (Pospelova and Barnaulov, 2010), псоріазу (Kumar, 2012) та багатьох інших. Медичних п'явок використовують, головним чином, при трансплантаціях із метою усунення венозного застою (конгестії) (Eldor et al., 1996; Chereha et al., 2002; Frodel et al., 2004; Mineo et al., 2004; Hullett et al., 2007; Bank et al., 2008; Mumcuoglu, 2014).

Установлено оптимальні та цитотоксичні концентрації антигенів сольового екстракту медичної п'явки для фагоцитарної реакції нейтрофілів і реактивності лімфоцитів у людини (Aminov, 2015). Зараз гірудотерапія широко застосовується у ветеринарії для лікування захворювань собак, котів, коней (Sobczak and Kantyka, 2014). Гірудотерапія кіз супроводжується міграційним перерозподілом лімфоцитів крові з тимчасовим їх депонуванням у місцях приставлення медичної п'явки, підвищенням ФАН (Frolov et al., 2010). Дослідження впливу гірудотерапії на організм корів вказують на ефективність БАР медичної п'явки, приставлених на біологічно активні проєкції, 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 (Popova, 2003).

Мета наших досліджень – оцінити стан фагоцитарної та метаболічної активності нейтрофільних гранулоцитів крові нелінійних самок щурів, їх приплоду в динаміці за впливу біологічно активних речовин медичної п'явки. Вперше досліджується дозований вплив антигенів сольового екстракту на імунологічні процеси щура, народженого від самки, яка зазнала впливу антигенів медичної п'явки.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили у навчально-науково-дослідній лабораторії клітинної та організмової біотехнології Запорізького національного університету. Самкам нелінійних щурів 2 тижні до і 2 тижні після парування вводили внутрішньочеревно антигени сольового екстракту медичної п'явки *Hirudo verbana* Carena, 1820 (4 ін'єкції), отримані методом, запропонованим Frolov (2013). Дозування антигенів сольового екстракту здійснювали за вмістом білка (визначали за Лоурі). Фіксували тварин за допомогою фіксувального пристрою (Aminov, 2015). Тварин розподіляли на три групи: перша експериментальна група тварин перебувала під впливом антигенів сольового екстракту медичної п'явки у кількості 0,5 мл (із розрахунку 3 мкг/г маси тіла тварини); друга інтактна група тварин на зазнавала втручання, третій, контрольній групі тварин внутрішньочеревно вводили фізіологічний розчин (0,5 мл). Досліджували самок після вигодовування приплоду, а також приплід у динаміці на 1, 15, 30, 45, 60-ту добу.

Експериментальні дослідження виконані з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, згідно із Законом України від 21.02.2006 р. № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» та згідно з етичними нормами та правилами роботи з лабораторними тваринами.

Тварин утримували в умовах віварію на стандартному раціоні в індивідуальних клітках. Усього в експерименті задіяно 60 самок нелінійних щурів та 300 екземплярів приплоду. Всіх тварин декапітували під ефірним наркозом, досліджували імунологічні показники (кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу крові, фагоцитарну активність нейтрофілів: фагоцитарний індекс (ФІ), фагоцитарне число (ФЧ), спонтанний та стимульований тест на відновлення нітросинього тетразолу (НСТ-тест)) на 1, 15, 30, 45, 60-ту добу експерименту (Berkalo et al., 2003). Стимулювали за допомогою 1% суспензії дріжджів.

Терміни проведення експерименту обрані з урахуванням загально визнаного поділу вікових періодів у щурів. З 1-ї по 5-ту добу життя триває період новонародженості, з 6-ї по 21-шу добу – підсосний період, з 22-ї по 50-ту добу – період становлення статевої зрілості, з 60-ї доби – період статевої зрілості (Zapadniuk et al., 1983). Контрольну групу тварин об'єднали з інтактною, оскільки після дослідження цих груп тварин отримано дані, які статистично значимо не відрізнялися між собою. У подальших дослідженнях для порівняння з експериментальною групою використовували контрольну групу.

Статистичну обробку результатів проводили методом обчислення середньої арифметичної, помилки середньої арифметичної, середнього квадратичного відхилення за допомогою комп'ютерної програми SPSS v.21.0. Достовірність різниці між показниками визначали за t-критерієм Стьюдента, попередньо перевіривши вибірки на нормальність розподілу.

Результати та їх обговорення

У самок, яким вводили внутрішньочеревно антигени сольового екстракту медичної п'явки у преємбріональний та ембріональний періоди розвитку, та у їх приплоду на всіх етапах раннього онтогенезу відзначали односпрямовані зміни до їх збільшення порівняно з контролем (табл. 1). Самок виводили з експерименту на 60-ту добу. У них проявлялась значна тенденція до збільшення кількості лейкоцитів у периферійній крові у дослідних щурів до $11,7 \pm 0,5$ при $6,9 \pm 0,2$ в контрольній

групі тварин $P < 0,05$ (табл. 2). Порівняльний аналіз лейкоцитарної формули крові в дослідних групах самок щурів не виявив системних відмінностей (табл. 1).

Ці дані свідчать про гомеостатичний розвиток вроджених і адаптивних ланок імунної системи досліджених щурів за впливу БАР медичної п'явки. Як і у дослідних самок щурів, у їх приплоду також спостерігали збільшення показників лейкоцитів. Поглинальна активність нейтрофілів тварин (рис. 1) за впливу антигенів медичної п'явки проявлялась збільшенням ФІ в усіх термінах дослідження, статистично значима на першу добу та у самок (табл. 2).

ФЧ збільшується з 15-ї доби, статистично значиме збільшення на 15, 30 та 45-ту добу, статистично значиме зниження на першу добу та у самок. Ці дані збігаються з літературними даними про збільшення фагоцитарної активності нейтрофілів за впливу БАР медичної п'явки. Нейтрофіли – перша лінія захисту від проникнення в організм різноманітних бактерій, грибів і найпростіших. Тому збільшення поглинальної активності може свідчити про підвищення функціонально-захисної здатності клітин до фагоцитозу (поглинання, руйнування та виведення з організму чужорідного матеріалу).

Ці дані підтверджуються під час дослідження окисно-відновної активності нейтрофілів у самок щурів та їх приплоду (рис. 2). За впливу антигенів медичної п'явки НСТ спонтанний та НСТ стимульований тести статистично значимо збільшувалися у самок та їх приплоду на всіх термінах дослідження порівняно з контролем (табл. 2).

Таблиця 1

Загальна кількість лейкоцитів і лейкоцитарна формула крові самок щурів та їх приплоду ($M \pm m$, $n = 360$)

Доба	Групи тварин	Лейкоцити, 10^9 кл./л	Лейкоцитарна формула крові, %					
			нейтрофіли			лімфоцити	моноцити	еозинофіли
			паличкоядерні	сегментоядерні	загальний відсоток			
1-ша	контроль	$8,0 \pm 1,1$	$37,2 \pm 4,8$	$17,0 \pm 3,8$	$54,2 \pm 5,0$	$39,9 \pm 4,9$	$5,9 \pm 2,4$	0
	дослід	$8,9 \pm 0,9$	$28,5 \pm 4,5$	$18,4 \pm 3,9$	$46,9 \pm 5,0$	$50,2 \pm 5,0^*$	$2,3 \pm 1,5$	$0,64 \pm 0,08^*$
15-та	контроль	$4,4 \pm 0,3$	$3,8 \pm 1,9$	$9,4 \pm 2,9$	$13,2 \pm 3,4$	$83,2 \pm 3,8$	$3,4 \pm 1,8$	$0,20 \pm 0,04^*$
	дослід	$6,0 \pm 0,8^*$	$6,7 \pm 2,5$	$14,6 \pm 3,5$	$21,3 \pm 4,1^*$	$75,7 \pm 4,3$	$2,7 \pm 1,6$	0
30-та	контроль	$5,3 \pm 0,7$	$3,6 \pm 1,9$	$2,7 \pm 1,6$	$6,4 \pm 2,4$	$89,0 \pm 3,1^*$	$4,7 \pm 2,1$	0
	дослід	$4,6 \pm 0,3$	$8,2 \pm 2,7^*$	$6,7 \pm 2,5$	$15,0 \pm 3,6^*$	$79,7 \pm 4,0$	$5,2 \pm 2,2$	$0,50 \pm 0,07^*$
45-та	контроль	$6,3 \pm 1,3$	$2,3 \pm 1,5$	$6,0 \pm 2,4$	$8,3 \pm 2,8$	$89,5 \pm 3,1$	$2,0 \pm 1,4$	$0,17 \pm 0,04$
	дослід	$6,5 \pm 1,0$	$3,3 \pm 1,9$	$7,4 \pm 2,6$	$10,7 \pm 3,1$	$85,2 \pm 3,5$	$3,8 \pm 1,9$	$0,28 \pm 0,05^*$
60-та	контроль	$4,5 \pm 0,3$	$4,7 \pm 2,1$	$5,7 \pm 2,3$	$10,3 \pm 3,0$	$87,0 \pm 3,4^*$	$2,7 \pm 1,6$	0
	дослід	$7,2 \pm 0,7^*$	$13,5 \pm 3,4^*$	$7,8 \pm 2,7$	$21,3 \pm 4,1^*$	$74,0 \pm 4,4$	$3,8 \pm 1,9$	$0,84 \pm 0,09^*$
Самки	контроль	$6,9 \pm 0,2$	$7,7 \pm 2,7$	$18,7 \pm 3,9$	$26,4 \pm 4,4$	$71,8 \pm 4,5$	$1,3 \pm 1,1$	$0,45 \pm 0,07$
	дослід	$11,7 \pm 0,5^*$	$6,0 \pm 2,4$	$17,7 \pm 3,8$	$23,7 \pm 4,2$	$72,1 \pm 4,5$	$3,8 \pm 1,9$	$0,40 \pm 0,06$

Примітка: * – показники, що достовірно відрізняються від контролю за $P < 0,05$.

Таблиця 2

Імунологічні показники крові самок щурів та їх приплоду ($M \pm m$, $n = 360$)

Показники	Групи тварин	Доба					Самки
		1-ша	15-та	30-та	45-та	60-та	
Фагоцитарний індекс, %	контроль	$32,0 \pm 4,8$	$64,0 \pm 4,8$	$39,0 \pm 4,9$	$41,0 \pm 4,9$	$60,8 \pm 4,9$	$37,5 \pm 4,8$
	дослід	$45,0 \pm 4,9^*$	$66,0 \pm 4,7$	$39,4 \pm 4,9$	$44,4 \pm 5,0$	$65,8 \pm 4,7$	$46,5 \pm 5,0$
Фагоцитарне число	контроль	$2,60 \pm 0,10^*$	$3,35 \pm 0,17$	$1,98 \pm 0,10$	$2,88 \pm 0,14$	$3,02 \pm 0,15$	$3,01 \pm 0,15^*$
	дослід	$1,84 \pm 0,10$	$5,39 \pm 0,27^*$	$2,84 \pm 0,14^*$	$3,57 \pm 0,18^*$	$3,21 \pm 0,16$	$2,26 \pm 0,11$
НСТ спонтанний, %	контроль		$71,7 \pm 4,5$	$72,2 \pm 4,5$	$63,7 \pm 4,8$	$54,9 \pm 5,0$	$51,2 \pm 5,0$
	дослід		$93,3 \pm 2,5^*$	$91,8 \pm 2,7^*$	$92,1 \pm 2,7^*$	$85,4 \pm 3,5^*$	$86,8 \pm 3,4^*$
НСТ стимульований, %	контроль		$68,4 \pm 4,6$	$70,0 \pm 4,6$	$74,0 \pm 4,4$	$72,0 \pm 4,5$	$51,2 \pm 5,0$
	дослід		$87,5 \pm 3,3^*$	$87,8 \pm 3,3^*$	$92,5 \pm 2,6^*$	$91,8 \pm 2,7^*$	$89,8 \pm 3,0^*$

Примітка: * – показники, що достовірно відрізняються від контролю за $P < 0,05$.

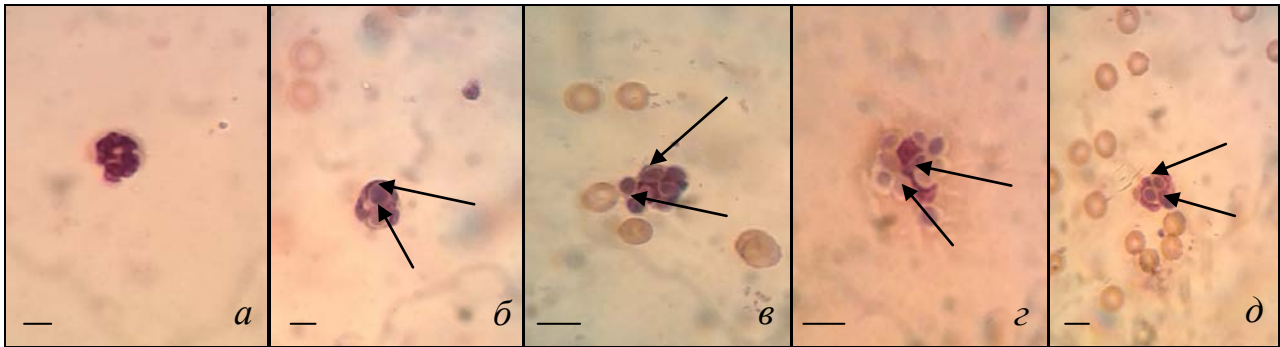


Рис. 1. Фагоцитарна активність нейтрофілів за впливу сольового екстракту антигенів медичної п'явки:
a – неактивований нейтрофіл; *б–д* – активовані нейтрофіли; стрілками помічені дріжджі, захоплені нейтрофілом;
 довжина бара – 10 мкм; забарвлення за Романовським – Гімза

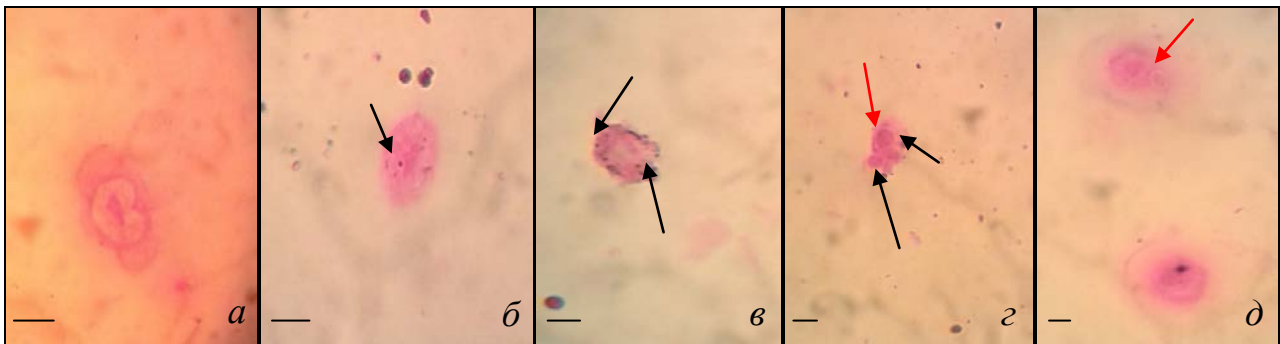


Рис. 2. НСТ-тест за впливу сольового екстракту антигенів медичної п'явки:
a – неактивований нейтрофіл, *б* та *в* – НСТ спонтанний тест (стрілками помічені гранули нітросинього тетразолу),
г та *д* – НСТ стимульований тест (чорними стрілками помічені гранули нітросинього тетразолу,
 а червоними – гранули дріжджів); довжина бара – 10 мкм; забарвлення 1% сафраніном

Тест із нітросинім тетразолієм відображає ступінь активації кисневозалежних механізмів бактерицидності фагоцитарних клітин, тому підвищення НСТ тестів і фагоцитарних показників свідчать про підвищену активацію до бактеріального процесу та підвищений захист за допомогою фагоцитозу чужорідного матеріалу клітинами в організмі. Позитивні зміни імунологічних показників свідчать про імуностимулювальний вплив антигенів медичної п'явки на лейкопоез і полінуклеарні нейтрофіли – першу лінію захисту від проникнення в організм різних бактерій, грибів і найпростіших. Ці дані збігаються з даними літератури (Zharov, 2003; Savinov, 2004; Kamenev and Vaganovski, 2006; Gerashhenko, 2007) про вплив медичної п'явки на ФАН та лейкоцити периферичної крові, оскільки вже встановлено, що секрет слинних залоз медичної п'явки стимулює ФАН. Оригінальні дослідження (Frolov et al., 2008) присвячені вивченню впливу гірудотерапії на функціональну активність макрофагів при захворюваннях, що супроводжуються вторинними імунодефіцитними станами (наприклад синдрому психоемоційного вигорання), показали: гірудотерапія забезпечує активацію попередньо знижених фагоцитарних показників моноцитів або макрофагів до нижньої межі норми та підвищення функціональної активності системи фагоцитуючих макрофагів. Але, порівняно з дослідженнями інших авторів, вперше досліджено дозований вплив антигенів сольового екстракту на імунологічні процеси шурів, народжених від самки, яка зазнала впливу антигенів медичної п'явки.

Висновки

Виявлено позитивний вплив антигенів сольового екстракту медичної п'явки на поглинальну та метаболічну активність нейтрофілів у самок та їх приплоду на різних термінах дослідження порівняно з контролем, збільшення кількості лейкоцитів за рахунок зміни проліферації на диференціацію та депонування клітин в імуногенних органах. Зміни імунологічних показників свідчать про імуностимулювальний вплив антигенів медичної п'явки на лейкопоез та функціональну активність нейтрофілів – першу лінію захисту від проникнення в організм різноманітних бактерій, грибів і найпростіших.

Бібліографічні посилання

- Abdullah, S. (ed.), 2012. Hirudotherapy. Leech therapy: Applications and indications in surgery. Arch. Clin. Exp. Surg. 1(3), 172–180.
- Aminov, R.F., Frolov, O.K., 2015. Vplyv biologichno aktyvnykh rehovyn sol'ovogo ekstraktu medychnoi' p'yavky na fagocytarnu aktyvnist' nejtrofiliv i cytomorfometrychni zminy limfocytiv krovi ljudyny u kul'turi [Influence of biologically active substances in the salt extract of the medicinal leech on phagocytic activity of neutrophils and cytomorphometric changes of blood lymphocytes in culture]. Naukovyj Visnyk Chernivets'kogo Universytetu Biologija 7(1), 108–112 (in Ukrainian).

- Aminov, R.F., Frolov, O.K., Fedotov, J.R., 2016. Prystrij dlja fiksacii' dribnyh laboratornyh tvaryn Ukrainy [Device for fixation of small animals laboratory]. Pat. 107289 (in Ukrainian).
- Bank, J. (ed), 2008. Medicinal leech fixation in precarious locations. *J. Reconstr. Microsurg.* 24, 67–68.
- Berkalo, L.V. (ed), 2003. Metody klinichnyh ta eksperymental'nyh doslidzen' v medycyni [Methods of clinic experimentalnih dozen in charity fund medical]. Polimet, Poltava (in Ukrainian).
- Chepeha, D.B. (ed.), 2002. Leech therapy for patients with surgically unsalvageable venous obstruction after revascularized free tissue transfer. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 128, 960–965.
- Eldor, A., Orevi, M., Rigbi, M., 1996. The role of the leech in medical therapeutics. *Blood Rev.* 10, 201–209.
- Frodel, J., Barth, P., Wagner, J., 2004. Salvage of partial facial soft tissue avulsions with medicinal leeches. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 131, 934–939.
- Frolov, A.K., Kopejka, V.V., Fedotov, E.R., 2010. Vlihanie girudoterapii na fiziologicheskie pokazateli u koz [The impact of treatment on physiological parameters in goats]. *Tvarynyctvo Ukrainy* 7, 7–10 (in Ukrainian).
- Frolov, V.M. (ed.), 2008. Dinamika pokazatelej fagocitarnoj aktivnosti monocitov perifericheskoy krovi u bol'nyh s sindromom psihoemocional'nogo vygoranija pri girudoterapii [Dynamics of phagocytic activity of monocytes of peripheral blood in patients with burnout syndrome in hirudotherapy]. *Ukrains'kij Medichnij Al'manah* 11(4), 175–178.
- Gerashhenko, L., 2007. Vsjo o pijavke. Girudoterapija dlja raznyh tipov ljudej [All about leech. Leech therapy for different types of people]. Piter, Saint Petersburg (in Russian).
- Hildebrandt, J.P., Lemke, S., 2011. Small bite, large impact-saliva and salivary molecules in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*. *Naturwissenschaften* 98(12), 995–1008.
- Hullett, J.S., Spinnato, G.G., Zi, V., 2007. Treatment of an ear laceration with adjunctive leech therapy: A case report. *J. Oral. Maxillofac. Surg.* 65, 2112–2114.
- Isahanjan, G.S., Arutjunjan, V.M., 1991. Medicinskie pijavki ih lechebnoe primenenie v terapevticheskoj klinike. *Terapevticheskij Arhiv* 63(8), 110–112.
- Kamenev, O.J., Baranovskij, A.J., 2010. Lechenie pijavkami – teorija i praktika girudoterapii [Treatment by leeches: Theory and practice hirudotherapy]. Ves', Saint Petersburg (in Russian).
- Kumar, S.A., 2012. Antiinflammatory effect of leech therapy in the patients of psoriasis. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation* 1(1), 71–74.
- Mineo, M., Jolley, T., Rodriguez, G., 2004. Leech therapy in penile replantation: A case of recurrent penile self-amputation. *Urology* 63, 981–983.
- Mumcuoglu, K.Y., 2014. Recommendations for the use of leeches in reconstructive plastic surgery. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*
- Popova, I.S., 2003. Vosproizvoditel'naja sposobnost' molochnyh korov raznyh genotipov i ispol'zovanie girudopunktury dlja ee korrekcii [Reproductive ability of dairy cows of different genotypes and the use of gyrodometry its correction]. Voronezh, P. 1–21 (in Russian).
- Pospelova, M.L., Barnaulov, O.D., 2010. Effects of hirudotherapy on intravascular thrombosis activation in different groups of patients with cerebrovascular pathologies. *Aktuelnosti Neurol. Psihijatrije Granicnih Podrucja* 18(3), 27–32.
- Savinov, V.A., 2004. Girudoterapija [Hirudotherapy]. Medicina, Moscow (in Russian).
- Sobczak, N., Kantyka, M., 2014. Hirudotherapy in veterinary medicine. *Annals of Parasitology* 60(2), 89–92.
- Zapadnjuk, I.P., Zapadnjuk, V.I., Zaharija, E.A., 1983. Laboratornye zhivotnye. Razvedenie, sodержanie, ispol'zovanie v jeksperimente [Laboratory animals. Breeding, keeping, use in the experiment]. Vishha Shkola, Kiev (in Ukrainian).
- Zharov, D.G., 2003. Sekrety girudoterapii ili kak lechit'sja pijavkami [Secrets of treatment or how to treat leeches]. Feniks, Rostov (in Russian).

Надійшла до редколегії 12.09.2016