Акционерное общество «Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ»

На правах рукописи

ЕФИМОВА АЛЕНА ОЛЕГОВНА

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТА *HIRUDO MEDICINALIS,* МАЗИ И ГЕЛЯ НА ЕГО ОСНОВЕ ПРИ НАКОЖНОМ ПРИМЕНЕНИИ

(экспериментальное исследование)

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
Доктор биологических наук, профессор
Митрохин Николай Михайлович

Старая Купавна, 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

В системе здравоохранения большое внимание уделяют созданию новых высокоэффективных и безопасных лекарственных средств (Shakouri A. et al., 2018; Meng Z., Huang R., 2018), в том числе сердечно-сосудистой и противовоспалительной направленности. Регулярно, при терапии препаратами, представленными как продуктами химического синтеза, так и животного или растительного происхождения, отмечаются побочные эффекты (Quan L. et al., 2016), что в некоторых случаях ограничивает возможность их клинического применения.

Актуальна проблема поиска новых потенциальных лекарственных средств (Heier C. R. et al., 2013, Пахомова Е.Е. и др., 2015, Эмедова Т.А. и др., 2015, Nishino H. et al., 2016). Отправной точкой исследований является многовековая история применения классических методов лечения - фитотерапия, апитерапия, гирудотерапия и др., которые наряду с высокой терапевтической активностью демонстрируют минимальные побочные эффекты (Слободская Н.С., 2016). Большинство известных антикоагулянтов обладают побочными эффектами, настороженным отношением к их применению в терапии различных заболеваний (Латфуллин И.А., Подольская А.А., 2006; Марцевич С.Ю., Лукина Ю.В., 2011; Capodanno D. et al., 2016; Sherman R. A., Cooper E. L., 2018).

Анализ многовековой истории успешного применения медицинских пиявок для лечения ряда заболеваний свидетельствует о высокой антитромботической эффективности компонентов секрета слюнных желез пиявок (Frolov A. K., Litvinenko R. A., 2015). Особого внимания заслуживают положительные результаты гирудотерапии при сердечно-сосудистых заболеваниях, в процессе лечения которых проявляются противотромботическое, тромболитическое и противовоспалительное действия комплекса биологически активных веществ (БАВ) пиявки медицинской *Hirudo medicinalis* (Никонов Г.И., 1998; Баскова И.П., 2004; Neun B. W., Dobrovolskaia M. A., 2018).

Пиявка *Hirudo medicinalis* является источником уникальных соединений, синтезируемых только этим видом животных. Прежде всего, это гирудин - высокоспецифичный ингибитор тромбина (Баскова И.П., Исханян Г.С., 2004); простагландины по спектру фармакологического действия подобные простациклину ($PGF_{1\alpha}$), которые обеспечивают, в первую очередь, блокаду тромбоцитарно-сосудистого звена внутреннего механизма свертывания крови (Nesemann H., 1999; Siddall, M.E., 2011; Lui C., Barkley Jr T. W., 2015); дестабилазный комплекс – пример природной липосомы полифункционального (прежде всего, противотромботического и тромболитического) действия (O'Donnell M.J., 1997; Trontelj P., 2004; Frolov A. K., Litvinenko R. A., 2015). Понимание механизмов действия секрета слюнных желез (ССЖ) медицинских пиявок позволит целенаправленно использовать этот природный ингибитор тромбообразования в качестве фармакологического средства.

До настоящего времени в качестве лекарственных форм препаратов на основе медицинской пиявки используют жидкие (в виде растворов для внутривенных инъекций) или твердые лекарственные формы (в виде таблеток или капсул).

Степень разработанности темы

Пиявка медицинская *Hirudo medicinalis* имеет многовековой опыт успешного применения в классической и современной медицине (Петров И.Р. и соавт., 1936; Никонов Г.И. и соавт., 1995; Рассадина Е.В., 2006; Linnaeus C., 1758). Более чем полуторавековая история изучения механизмов действия биологически активных соединений, продуцируемых медицинскими пиявками, создает предпосылки для расширения области применения гирудотерапии и создания ряда лекарственных препаратов на их основе (Никонов Г.И. и соавт., 1998, 2015; Baskova I.P. et al., 2008; Elliott, J.M., 2011). Экстракт пиявок является источником уникальных компонентов, действие которых направлено на профилактику и лечение тромбозов, атеросклероза, гипертензии, воспалительных процессов, сердечно-сосудистых и кожных заболеваний и т.д. (Волк Р.Б., 1950; Геращенко Л., 2008; Григорьев Г.Н., 1998; Davies R.W. McLoughlin N.J., 1996). Разработанные и внедренные в практику лекарственные формы: гирулюкс и пиявит (желатиновые капсулы для перорального применения) являются препаратами «первого поколения», поскольку входящий в их состав комплекс биологически активных веществ, продуцируемых медицинскими пиявками обеспечивает: профилактику и лечение тромбозов, атеросклероза, гипертензии, воспалительных процессов, сердечно-сосудистых и кожных заболеваний и т.д. В тоже время, при ряде патологий, связанных с нарушениями в системе свертывания крови, а также для профилактики послеоперационных тромбозов возникает необходимость направленного антикоагулянтного действия, без воздействия на системы фибринолиза, комплемента и внешний механизм свертывания крови (Никонов Г.И. и соавт., 2001; Баскова И.П., Исаханян Г.С., 2004; Лебедева А.О. и соавт., 2014). В исследовании B. Risberg, H.I. Peterson (1976), изучено влияние «гирудоид» крема на процесс фибринолиза на моделях кожи крыс и человека, подтверждено положительное влияние крема в лечении тромбофлебита.

Предметом настоящего исследования явилось изучение фармакологических свойств и общетоксического действия субстанции и мягких лекарственных форм на основе экстракта пиявки медицинской.

Цель исследования

Экспериментальное обоснование применения мази и геля с экстрактом медицинской пиявки для терапии воспалительных, геморрагических, раневых повреждений, снижения активности свертывающей системы крови.

Задачи исследования:

1. Исследовать противовоспалительное действие экстракта пиявки медицинской (ЭМП), мази и геля на основе ЭМП на моделях воспаления у животных при формалиновом отеке лапы у мышей и «фетровой» гранулемы у крыс в сравнении с эффектами аналогичных лекарственных форм гепарина и диклофенака натрия.

2. Провести сравнительное исследование терапевтической эффективности ЭМП, геля с ЭМП и гепаринового геля при геморрагических повреждениях (экспериментальная подкожная гематома) мягких тканей у крыс.

3. Провести сравнительное исследование противовоспалительной активности при ранах и ожогах перспективных лекарственных препаратов с ЭМП, гепариновой мази и геля при наружном применении.

4. Исследовать противосвертывающую активность ЭМП, мази и геля с ЭМП в сравнении с активностью мази и геля гепарина при накожном применении у интактных кроликов.

5. Провести изучение острой токсичности, общетоксического и местнораздражающего действия разработанных мягких лекарственных форм на основе ЭМП, как потенциальных лекарственных средств.

Научная новизна

Впервые показано, что:

- субстанция, гель и мазь гирулюкс обладают высокой противовоспалительной эффективностью на модели формалинового отека лапы у мышей и «фетровой» гранулемы у крыс. По выраженности противовоспалительного эффекта препараты гирулюкс уступают мази с диклофенаком, но превосходят мазь с гепарином;
- ЭМП, гель и мазь на его основе в экспериментах на крысах проявляют противовоспалительную активность при ожогах, заключающуюся в ускорении заживления ожоговых травм;
- при накожных аппликациях происходит достоверное увеличение времени свертывания крови интактных кроликов в 1,3 раза при накожной аппликации мази гирулюкс, и в 1,2 раза, при аналогичной аппликации геля гирулюкс;
- ЭМП, разработанные мазь и гель ЭМП при накожном применении не вызывают летальных исходов или токсических эффектов вплоть до дозы 4000 мг/кг;
- по действию на гематологические, биохимические, интегральные показатели, функциональное состояние систем и органов, морфологическую структуру внутренних органов экспериментальных животных мягкие лекарственные формы ЭМП «гирулюкс, мазь для наружного применения» и «гирулюкс, гель для наружного применения» не вызывают токсические эффекты,

местное раздражающее действие в дозах, многократно превышающих терапевтические для человека.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты свидетельствуют о возможности регистрации в Российской Федерации потенциальных лекарственных препаратов «гирулюкс, мазь для наружного применения» и «гирулюкс, гель для наружного применения» для применения в качестве противовоспалительного и противосвертывающего средства на основе экстракта пиявки медицинской лиофилизированной.

Методология и методы исследования

Работа по изучению специфической фармакологической активности выполнена на лабораторных грызунах и включает эксперименты на интактных животных и животных с экспериментальным воспалением. ЭМП лиофилизированной применяли наружно в терапевтической дозе. Расчёт доз проводили, используя коэффициент пересчета доз с животного на человека согласно методическим указаниям, в "Руководстве по экспериментальному изучению новых фармакологических веществ" (2012). Исследование противовоспалительного действия ЭМП лиофилизированной и потенциальных мягких лекарственных форм на ее основе - «гирулюкс, мазь для наружного применения» и «гирулюкс, гель для наружного применения» - проводили на моделях «формалинового» отека лапы у мышей и «фетровой» гранулемы у крыс (Шварц Г.Я., Сюбаев Р.Д., 2000). Ранозаживляющие свойства оценивали в экспериментах на крысах, которым наносили послойные кожные раны (Алипов В.В., 2010). Противоожоговые свойства изучали на модели ожогов кожи у крыс (Колсанов А.В., Алипов В.В., Добрейкин Е.А., 2011). Влияние на скорость рассасывания подкожных экстравазаций крови оценивали, моделируя геморрагические повреждения мягких тканей у крыс механическим воздействием (Шварц Г.Я., Сюбаев Р.Д., 2000). Оценку противосвертывающей активности осуществляли в экспериментах на кроликах, путем регистрации тромбоэластограмм.

В соответствии с требованиями Минздрава России при регистрации лекарственные формы препарата подлежат токсикологическому исследованию в остром и субхроническом эксперименте с оценкой местного раздражающего действия. В соответствии с вышесказанным исследования выполняли согласно утвержденному письменному протоколу и стандартным операционным процедурам (СОП) лаборатории фармакологии АО «Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ». В эксперименте определялись интегральные показатели, функциональное состояние основных систем: гематологические, биохимические показатели, гистологические изменения органов и тканей. В работе применялись фармакологические, гистологические, биохимические, статистические методы исследования.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в определении цели исследования и путей ее реализации, планировании и выполнении эксперимента. Все эксперименты проведены автором лично или при его активном участии. Автором проводились фармакологические и токсикологические виды исследований, анализ, статистическая обработка, научное обоснование и обобщение полученных результатов. Публикации подготовлены при активном участии автора.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

В диссертационной работе использованы современные методики, позволяющие получить достоверную информацию о фармакологической активности (противовоспалительной, антикоагулянтной) потенциальных лекарственных препаратов на основе экстракта пиявки *Hirudo medicinalis*. Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом проанализированного материала по изучаемой теме, использованием методик, адекватных поставленным задачам и применением современных методов анализа. Обоснованность научных выводов и положений подтверждается результатами проведенных экспериментальных исследований и не вызывает сомнений. Выводы объективно и полноценно отражают полученные результаты. С учетом вышеизложенного результаты проведенного исследования следует считать достоверными.

Основное содержание диссертации опубликовано в 11 научных работах, в том числе 4 в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве образования и науки Российской Федерации для публикации основных научных результатов диссертации.

Тема данного исследования утверждена на заседании Ученого совета АО «Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ» (протокол № 4 от 18.11.2014 г.) и включена в план научно-исследовательской работы (НИР).

Связь темы диссертации с планом научно-исследовательской работы учреждений Диссертационная работа выполнена в рамках комплексной темы лаборатории фармакологии АО «ВНЦ БАВ» и ЗАО «МЦМП» на основании договора о совместном сотрудничестве.

Внедрение в практику результатов исследований

При изучении специфической фармакологической активности исследуемых препаратов определены показания к применению геля и мази. В рамках совместного научного сотрудничества АО «ВНЦ БАВ» с ЗАО «МЦМП» произведены опытно-промышленные партии потенциальных препаратов. Выявленная перспективность использования исследуемых препаратов на основе ЭМП гирулюкс послужила обоснованием подготовки документации для регистрации лекарственных препаратов «гирулюкс, мазь для наружного применения» и «гирулюкс, гель для наружного применения».

Основные положения, выносимые на защиту:

1. ЭМП в экспериментах на животных при накожном применении обладает противовоспалительной и противосвертывающей активностями, способности восстановления мягких тканей при геморрагических повреждениях.

2. «Гирулюкс, мазь для наружного применения» и «гирулюкс, гель для наружного применения» с ЭМП лиофилизированной обладают противовоспалительной и противосвертывающей активностями в экспериментах

на животных.

3. Мягкие лекарственные формы ЭМП («гирулюкс, мазь для наружного применения» и «гирулюкс, гель для наружного применения») показали отсутствие выраженных токсических эффектов (острая, хроническая токсичность и местнораздражающее действие) при накожных аппликациях у животных.

Апробация работы

Основные материалы диссертации представлены на научном конгрессе «Первый Всемирный конгресс гирудотерапии» (Москва, 2013 г.), «Человек и лекарство» (Москва, 2014, 2015, 2016 гг.); Международной научно-практической конференции «Медицина XXI века: лечение до достижения цели» (Красноярск, 2014 г.); расширенных заседаниях отдела фармакологии АО «ВНЦ БАВ» (2015г); II Международной научно-практической конференции «Перспективы развития современной медицины» (г. Воронеж, 2015 г.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Выполненная работа соответствует паспорту специальности 14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки): пункт 3 – «Исследование механизмов действия фармакологических веществ в экспериментах на животных, на изолированных органах и тканях а также на культурах клеток», пункт 5 – «Экспериментальное (доклиническое) изучение безопасности фармакологических веществ – токсикологические исследования, включающие изучение токсичности потенциальных лекарственных препаратов и их готовых лекарственных форм в условиях острых и хронических экспериментов на животных».

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 123 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы (глава 1), материалов и методов (глава 2), результатов исследований (главы 3-4), обсуждения результатов (глава 5), выводов, практических рекомендаций, списка литературы. В тексте содержится 26 таблиц, 8 рисунков. Список литературы включает 213 источника, 104 - отечественных и 109 – зарубежных.

ГЛАВА 1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ КОМПОНЕНТОВ ПИЯВКИ МЕДИЦИНСКОЙ *HIRUDO MEDICINALIS* ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Ингибирование скорости свертывания крови

Впервые гирудин выделил из экстракта медицинских пиявок Д.Б. Хайкрафтом (1884г.). До появления гепарина, замедляющего свертывание крови, использовался экстракт из головной части пиявок. В 40-х годах А.В. Кирсанов и М.Н. Быстрицкая получили препарат гирудина-сырца. Очищенный гирудин был впервые выделен Ф. Марквардтом на основе разработанного им метода фракционирования экстракта из головной области медицинской пиявки. Эксперименты in vitro и in vivo показали, что гирудин, представляя собой специфический ингибитор фермента тромбина, формирует с тромбином неактивный стабильный нековалентный стехиометрический комплекс с константой диссоциации 6,3·10-13 М. Высокая специфичность гирудина по отношению к тромбину преимущественно выделяет его среди других природных ингибиторов этого фермента: антитромбина Ш, гепарина и а2-макроглобулина. В сравнении с синтетическими ингибиторами тромбина, гирудин является ингибитором данного фермента [И.П. Баскова с соавт., 1989].

Ингибирование активности тромбина проявляется в частичном или полном торможении свертывания фибриногена — и это далеко не единственная способность гирудина. В его присутствии замедляется функция активации тромбином факторов свертывания V, VIII, XIII. Гирудин может препятствовать агрегации тромбоцитов, ингибируя связывание тромбина эритроцитами. Гирудин активирует диссоциацию комплекса тромбина и специфических белков-рецепторов на тромбоцитах, поскольку тромбин обладает большим сродством к гирудину, чем к высокоаффинным рецепторам тромбоцитов [А.М. Вихерт, В.Н. Родионова, 1983; И.П. Баскова, Г.С. Исаханян, 2004].

Также отмечается удлинение тромбинового, отчасти тромбопластинового и протромбинового времени плазмы крови. Данные показатели системы свертывания крови восстанавливаются до оптимального уровня по мере выведения гирудина из организма. Содержание фибриногена, количество тромбоцитов, а также фибринолитическая активность плазмы остаются неизменными. Влияние гирудина на кровяное давление, частоту сердечных сокращений и дыхания не отмечалось.

В процессе окисления дисульфидных связей происходит потеря антитромбиновой способности гирудина. Химическая модификация свободных карбоксильных групп гирудина значительно уменьшает его сродство к тромбину. Это свидетельствует о том, что при комплексообразовании гирудина с тромбином реализуются ионные взаимодействия между молекулами (рис.1).

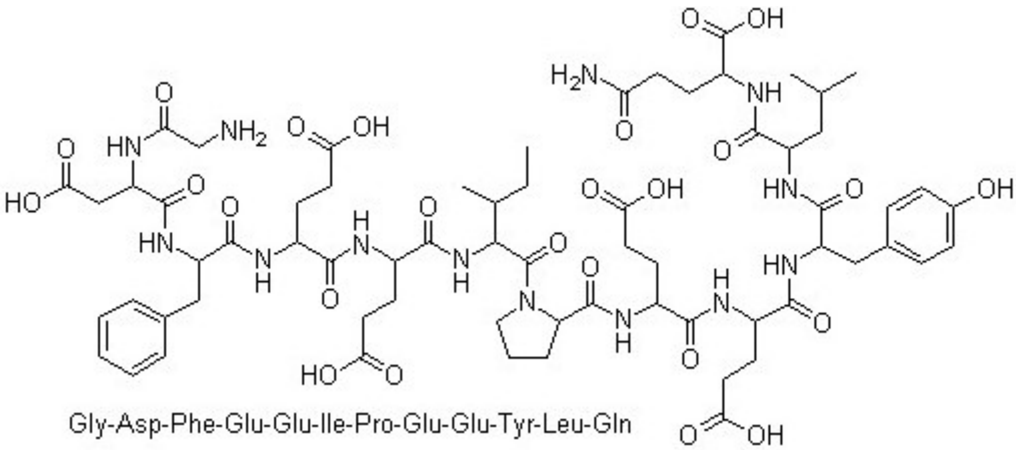

Рисунок 1. Структурная формула гирудина
[www.ecplaza.net/products/hirudin_3331751]

В процессе выделения гирудина из цельных медицинских пиявок ему сопутствует неактивный компонент из туловищ пиявок, названный псевдогирудином, но отличается от гирудина, тем, что содержит на N-конце валин. В гирудине присутствует более высокое содержание аспарагиновой и глутаминовой кислот, лизина, изолейцина и тирозина. Цистеина в псевдогирудине в разы ниже (примерно в 3 раза), чем в гирудине.

Заболевания вен нижних конечностей представляют наиболее «традиционную» область применения гирудотерапии. Несмотря на то, что лечение пиявками не входит в стандарты терапии, во многих источниках описывается положительный эффект данного метода у пациентов с венозной патологией, в основном с варикозной болезнью [Н.А. Тушмалова с соавт., 2001; Spear M., 2016; Isik M.et al., 2017].

1.2 Антитромбиновый эффект

Антитромбиновая активность обусловлена наличием в ССЖ медицинских пиявок гирудина - высокоспецифического природного ингибитора тромбина. Гирудин представляет собой полипептид с молекулярной массой 16 000. В состав белка входят более 65 аминокислот, важнейшими из которых являются глутамин, аспарагин, лизин, цистин, глицин, серин и некоторые другие. Пространственная структура формируется за счет множества дисульфидных связей, в результате чего природный гирудин представлен смесью различный изоформ белка (рис.1).

Гирудин связывает тромбин, в результате образуется соединение, слабо распадающееся в воде на ионы. Тромбин в связанном виде не проявляет протеолитические свойства, что приводит к торможению каскада коагуляции (рис. 2).

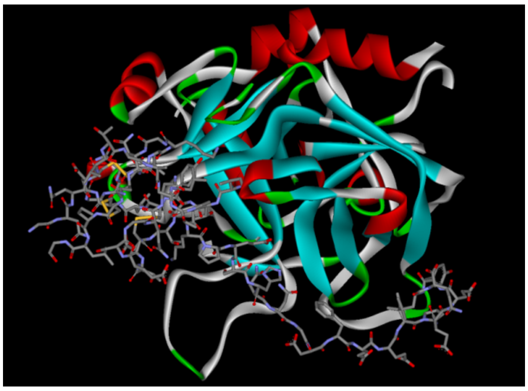

Рисунок 2. Комплекс гирудин-тромбин

За счет своего прицельного действия гирудин ощутимо влияет на свертываемость крови на всех ступенях реакции коагуляции, где роль ведущего коагулянта играет тромбин. Также гирудин блокирует несколько других реакций, в том числе тормозит образование собственно тромбина и тромбокиназы, уменьшает скорость процесса агрегации тромбоцитов. В крови человека содержится ингибитор тромбина – антитромбин III. В отличие от него, гирудин избирательно подавляет только способность тромбина к активации фибриногена.

Кроме того, обнаружена способность фермента растворять уже сформировавшиеся тромбы, т.е. тромболитическая активность.

Исследования подтвердили, что гирудин ведет себя как антикоагулянт быстрого действия при введении в организм. Гирудин сохраняется в организме в неизменном виде, и выводится почками в сохранном виде [Никонов Г.И. и соавт., 1989; И.П. Баскова и соавт., 1995].

В связи со сложностью изготовления гирудина в больших количествах непосредственно из желез медицинских пиявок, были разработаны методы пурификации этого белка с использованием рекомбинантных биотехнологий. Это привело к разработке ряда фармакологических продуктов на основе рекомбинантного гирудина [Кирсанов А.В., Черкесов В.М., 1938; Баскова И.П., 2004].

По некоторым аспектам, гирудин обладает преимуществом перед наиболее часто используемыми в клинической практике фибринолитиками и антикоагулянтами, поскольку не влияет на активность других белков плазмы. По результатам экспериментальных работ, гирудин и подобные ему вещества представляю собой перспективные антикоагулянты и могут рассматриваться как аналоги гепарина [Siddall M.E., 2007; Baskova I.P., 2008]. Уникальность ферментных свойст подтверждается увеличением количества научных публикаций по экспериментальному изучению его свойств и эффективности при различных тромботических состояниях, в том числе тромбозы коронарных, мозговых и др. артерий [Tosi, M.F., 2005; Baskova I.P., 2008; Trontelj, P., 2012].

Профилактика тромботических состояний с помощью применения ЭМП обусловлена свойствами секрета: способность ингибировать адгезию и агрегацию тромбоцитов, блокировать тромбин и ингибировать калликреин плазмы крови [Назарян А.А., 2001; Баскова И.П., Исаханян Г.С., 2004].

Для оценки противотромботических свойств препаратов, действие которых направлено на ингибирование тромбоцитарно-сосудистого гемостаза, широко используется экспериментальная модель тромбообразования в артериолах брыжейки крысы под действием лазера. В механизмах его регуляции ведущая роль принадлежит эндогенным ингибиторам адгезии и агрегации тромбоцитов, в том числе и простациклину, действие которого опосредуется через специфические мембранные рецепторы.

В работе И.П. Басковой и соавт. (1995) описано защитное противотромботическое действие ЭМП. Противотромботическое действие ЭМП выражалось в увеличении числа воздействий лазером, необходимых для повреждения эндотелия, уменьшении количества эмбол и сокращении времени эмболизации.

Показано, что до стимулирования тромбообразования, подкожное введение препаратов ЭМП также защищало животных от тромбоза [И.П. Баскова и соавт., 1995].

В данной модели ингибирование артериального тромбообразования обеспечивается компонентами ЭМП, блокирующими агрегацию тромбоцитов, в том числе аналогами простациклина, обнаруживаемыми иммуноферментным методом как 6-кето-простагландин-$F_{1\alpha}$. Басковой И.П. и Никоновым Г.И. (1987) было доказано, что простагландины содержатся не только в ССЖ и в головной области пиявки, но и в ее туловище. Этот факт дополнительно подтверждает целесообразность использования цельных пиявок для получения ЭМП. Следует обратить внимание на защитное действие концентрированного ЭМП против повреждения эндотелия сосуда воздействием лазера [Азаров Н.В. и соавт., 1999].

1.3 Тромболитический эффект

Тромболитический эффект ЭМП обусловлен присутствием в нем фермента дестабилазы. Дестабилаза – высокоспецифичный фермент - e-(g-Glu)-Lys-изопептидаза. Ее действие направлено на разрушение e-(g-Glu)-Lys-изопептидных связей [I.P. Baskova et al., 2018].

e-(g-Glu)-Lys-изопептидные связи представляют собой поперечные сшивки, необратимо связывающие белки друг с другом, что обеспечивает выполнение этими белками физиологических функций. В частности, такие поперечные сшивки (кросс-линкинги) образуются в стабилизированном фибрине – белке, являющимся структурной основой кровяного тромба [I.P. Baskova, G.I. Nikonov, S. Khalil, 1988].

Разрушить уже образовавшиеся изопептидные связи не представляется возможным, поскольку они не гидролизуются известными протеолитическими ферментами. В течение многих лет делались попытки обнаружить специфическую эндопептидазу, способную разрушать изопептидные связи. Поэтому дестабилаза – единственно известный на сегодняшний день фермент, катализирующий расщепление таких связей.

Дестабилаза является специфичным ферментом, обладающим тромболитическими свойствами и особым механизмом действия. Открытие дестабилазного комплекса подтверждает существование ранее неизвестного пути фибринолиза [V.A. Manuvera et al., 1997].

Действие классических фибринолитиков направлено на активацию природного пути фибринолиза, т.е. на активацию плазмина, способного гидролизовать стабилизированный фибрин. Отрицательный эффект реализации подобного механизма фибринолиза проявляется в отрыве тромба от сосудистой стенки. Это ведет к его миграции по кровеносным сосудам; к отрыу тромба от сосудистой стенки, на ней образуется раневая поверхность, которая вновь вызывает каскад биохимических реакций, активизирующих тромбообразование.

Отличаясь от плазмина, дестабилаза способна разрушать поперечные сшивки в белке и обеспечить сохранность полипептидных цепей по всему объему тромба. Таким образом, ее ферментативная активность приводит к образованию продукта, сохраняющего доменную структуру фибрина, что обусловливает постепенное растворение фибринового сгустка [Халиль С., 1987].

Кроме фибринолитической активности, дестабилаза способна ингибировать тромбообразование в артериолах [Завалова Л.Л., Баскова И.П., Кузина Е.В., 1993].

Дестабилаза ингибирует спонтанную и индуцированную антагонистами агрегацию тромбоцитов человека. Механизм ингибирования спонтанной агрегации остается пока неясным, поскольку в настоящее время отсутствует какая-либо определенная концепция относительно механизмов, стимулирующих этот процесс.

В то же время, этот показатель является важнейшим фактором риска, обуславливающим тромботические явления у относительно здоровых людей.

Что касается механизма ингибирования индуцированной агрегации тромбоцитов, то действие дестабилазы не опосредуется через активацию аденилатциклазы тромбоцитарных мембран и повышение уровня цАМФ. Можно предположить, что ингибирование агрегации тромбоцитов дестабилазой обусловлено ее защитным действием на мембраны тромбоцитов путем ее взаимодействия с высокоаффинными участками клеточных мембран. Это предположение коррелирует с экспериментальными данными, свидетельствующими о некоторой идентичности первичной структуры дестабилазы первичной структуре ряда адгезивных белков.

Наиболее интересной представляется потенциальная возможность растворения образовавшегося тромба при использовании препаратов ЭМП за счет тромболитической активности дестабилазы. Тромболитики применяются, как правило, при артериальных тромбозах, сопровождающихся критическими состояниями (инфаркт миокарда, инсульт и др.). Применение тромболитиков при варикотромбофлебитах неоправданно из-за высокой стоимости препаратов [Н.Г. Котлова и соавт., 1999; Butt A.M. et al., 2016; Karino M., 2018].

В эксперименте И.П. Басковой показано тромболитическое действие водного ЭМП при внутривенном и внутрижелудочном введении крысам, при тромбообразовании в яремной вене по методу Веслера.

Степень тромболизиса оценивали визуально по реканализации сосуда и путем взвешивания вырезанных и высушенных тромбов [И.П. Баскова с соавт., 1995].

Имеет место продолжительное воздействие ЭМП на предобразованные тромбы. Через 7 суток спонтанный лизис тромбов наблюдался в контрольной группе крыс на 40%, у животных, получивших однократно перорально ЭМП, - на 67%, а в случаях внутривенного введения ЭМП - на 78%.

Пероральное применение оказалось более эффективным - введение ЭМП приводило к полному растворению тромбов по сравнению с контролем [I.P. Baskova et al., 1988].

Аналогичным образом показано тромболитическое действие водного ЭМП. Степень тромболизиса увеличивалась с повышением концентрации ЭМП [F.S. Baranova, I.P. Baskova, A.T. Baranov, 1997]. Следует отметить, что при однократном и многократном введении ЭМП кровоточивость у животных не наблюдалось. По внешним признакам состояние опытных животных не отличалось от контрольных.

При рассмотрении препаратов местного применения - возможным направлением использования препаратов с ЭМП являются острое воспаление стенок поверхностных вен конечностей, тромбофлебиты.

Чаще всего острый тромбофлебит поражает варикозно-расширенные вены нижних конечностей (варикотромбофлебит) и показывает осложненное течение варикозной болезни, или посттромбофлебитической болезни. Также, тромбофлебит может развиваться в визуально неизменных поверхностных венах. В таком случае, при рецидивирующем характере заболевания, необходимо исключить паранеопластический этиогенез. При бластоматозных процессах у пациентов лидирует рак поджелудочной железы. Тромбофлебит может носить ятрогенный характер, когда развитие происходит после лечебной катетеризации и однократной пункции вены, чаще если она проходила одновременно с введением растворов раздражающих концентраций [Кутаков О.И., 1965; Матусов В., Завалова Л., Кузина Е., 1997].

Варикозное расширение вен является благодатной почвой развития тромбоза, так как сопровождающие дегенеративные изменения сосудистой стенки и замедление кровотока ведет к тромбообразованию. В венозной сети нижних конечностей создается комплекс условий для развития тромботического процесса, которому способствуют легкая ранимость стенки сосуда, статические перегрузки, деформация и расширение венозной стенки, несостоятельность клапанного аппарата. В случае изменения адгезивно-агрегационных свойств форменных элементов крови, на фоне венозного застоя и измененного кровотока в подкожных венах, риск возникновения тромбов чрезмерно высок [Baici A., 1984; Тихоненко О.А., 2000; Sig A.K. et al., 2017].

Стабильность реологических свойств крови и поддержание их оптимального состояния зависит от баланса активности свертывающей и противосвертывающей систем, состояния эндотелия и активности ламинарного кровотока. Множество факторов, способных нарушить этот баланс, стимулируя возникновение венозных тромбозов в различных клинических случаях, осложняя течение болезни. Среди них выделяются тромбофилические состояния (врожденные и приобретенные), обусловленные дефицитом естественных ингибиторов коагуляции или изменениями функционирования фибринолитической системы (дефицит антитромбина III, протеинов C и S, дисфибриногенемия, дефицит плазминогена и нарушение высвобождения его активатора, мутация гена протромбина и многие другие). Наличие «ошибки» и повреждений в системе гемостаза накапливаются с возрастом, и у пациентов старше 45 лет с каждым годом жизни увеличивается вероятность возникновения венозного тромбоза [J.Navarro-Fernández et al., 2016].

Факторами, провоцирующими тромбообразование в подкожных и глубоких венах, являются - оперативные вмешательства (особенно на нижних конечностях и органах малого таза), травматические повреждения костного аппарата, иммобилизация, гиподинамия (послеоперационная), постинфарктные состояния, паралич, парез, злокачественные новообразования. К причинам возникновения тромбофлебита можно отнести использование эстрогенсодержащих препаратов, принимаемых, которые могут использоваться как с контрацептивной, так и с заместительной целью - одним из побочных эффектов их применения может являться гиперкоагуляционный сдвиг гемостаза. Беременность, аборты, роды и послеродовый период часто осложняются тромбофлебитом, так как одновренно с изменением гормонального фона, снижением фибринолитической активности крови и увлечением содержания фибриногена, эти состояния сопровождаются дилатацией вен, венозным стазом, а в случае отслоения плаценты еще и выбросом в кровоток тканевого тромбопластина. Заболевания печени и почек, воспалительные заболевания кишечника могут способствовать нарушению баланса синтеза, инактивации и выведения компонентов свертывающей и фибринолитической систем [Н.Г. Котлова и соавт., 1999; Houschyar K.S. et al., 2015; Liu X. Et al., 2016].

Местная терапия острого тромбофлебита играет вспомогательную роль в схеме лечения и дополняет системные препараты. Среди местных средств используют мази с НПВП (диклофенак, вольтарен), венотониками, гепарином. В качестве общей терапии применяют антиагреганты и антикоагулянты, НПВП, полиферментные препараты, венотоники. Сочетание в препаратах ЭМП антиагрегантных, антикоагулянтных и фибринолитичексих свойств, уже описанных нами выше, делает оправданным их возможное применение при лечении острого тромбофлебита.

Ингибирование сосудисто-тромбоцитарного и плазменного звеньев гемостаза при этом будет препятствовать прогрессированию тромбоза, воздействие противовоспалительных агентов должно способствовать купированию воспаления в сосудистой стенке.

Дополнительным немаловажным аспектом действия ЭМП является его анальгетический эффект, наличие которого показано в экспериментах. Анализ действия ЭМП на болевую чувствительность крыс С. Халиль с соавт. (1987) в эксперименте при термическом раздражении кончика хвоста крысы при интраназальном введении ЭМП.

Примечательно, что секрет слюнных желез пиявки медицинской не обладает анальгезирующей активностью [Баскова И.П. и соавт., 1987]. Как отмечалось ранее, аналгезия при гирудотерапии (ГТ) обусловлена кининазами секрета, разрушающими кинины хозяина. Что касается природы анальгезирующего эффекта ЭМП, можно предположить, что он обусловлен действием нейропептидов с морфиноподобным эффектом, тем более что показано присутствие энкефалина в нервных клетках пиявки медицинской *Hirudo medicinalis* [N. Zipser, 1980].

Варикозная болезнь (ВБ) относится к числу наиболее частых заболеваний венозной системы во всех промышленно развитых странах. Среди общей заболеваемости на долю ВБ приходится 5%, однако, среди поражений периферического сосудистого русла ВБ встречается в 30-40% случаев [В.С. Савельев, 2012; Houschyar K.S. et al., 2015]. В развитых странах выявление варикозного расширения вен (ВРВ) составляет 20-55% [А.В. Покровский, 2006; F. Fowkes, 2007; В.С. Савельев, 2014]. В основе ВБ лежит стойкое необратимое расширение вен и нарушения дееспособности клапанного аппарата вследствие грубых патологических изменений венозной стенки в одном из трех венозных коллекторов: поверхностных, коммуникантных и глубоких вен.

Изучение физиологических процессов взаимодействия эндотелия и крови на клеточном уровне сформировало новый взгляд на патогенез варикозной болезни. Из эндотелиальных клеток выделяются 2 неустойчивых вазодилататора: простациклин (простагландин I2) и оксид азота NO, а также физиологически активный пептид - вазоконстриктор эндотелин-1. Простациклин и оксид азота действуют в роли локальных гормонов, имеющих много схожих признаков [Warner T.D., 1995; Lusher T.F., 1994; Sig A.K. et al., 2017; Shakouri A. et al., 2018].

Простагландин I2 (простациклин) представляет собой мощный ингибитор агрегации тромбоцитов и их адгезии к эндотелию. Он способен значительно уменьшать пролиферацию сосудистой ткани (путем уменьшения синтеза митогенов), практически не воздействуя на сосудистый тонус.

Окись азота - мощный вазодилататор и, более выражена, чем простациклин, способна ингибировать адгезию тромбоцитов к эндотелию, практически не влияя на их агрегацию. Оксид азота также может ингибировать адгезию нейтрофилов к эндотелию и действовать на связывание свободных радикалов кислорода. Другими его свойствами являются - способность угнетать пролиферацию гладкомышечных клеток венозной стенки (направленное действие через уменьшение синтеза митогенов) и уменьшение высвобождения ренина. Оксид азота может ингибировать пролиферацию эндотелия [Назарян А.А., 2001].

Продукция простациклина и окиси азота эндотелиальными клетками увеличивается одновременно, через брадикинин, АДФ (аденозиндифосфат) и тромбин [Alexandrovski Ya.A., 1992; Moffat A.D. et al., 2015; Sig A.K. et al., 2017].

Таким образом, эндотелий продуцирует вазодилататоры под непрерывным контролем тока крови. Осаждение АДФ, брадикинина на специфичные рецепторы, находящихся на поверхности эндотелиальных клеток, приводит к быстрому высвобождению пары медиаторов - вазорелаксантов (простациклина и оксида азота), действие которых синергичное. Синергичное действие простациклина и оксида азота в основном проявляется путем ингибирования агрегации тромбоцитов и уменьшением пролиферации гладкомышечных клеток сосудистой стенки, менее выражено - воздействуя на адгезию тромбоцитов к эндотелию. В физиологических условиях вазодилататоры имеют тенденцию к доминированию [Короткое К.Г., 1999; Spencer W., 2007].

Обратное действие к выработке простациклина и оксида азота - продукция вазоконстриктора эндотелина-1 в стандартных условиях происходит с меньшей скоростью, но более длительно. Однако, в разнообразных стрессовых моментах, связанных с нарушением венозной стенки, происходит его ускоренное высвобождение [И.П. Баскова, А.Н. Куланин, 1999; K.M. Shankar et al., 2014].

Эндотелин-1 — вазоконстриктор со сложной системой регуляции. Гладкомышечные клетки и эндотелий имеют два типа рецепторов к эндотелину-1: α и β. Взаимодействие эндотелина-1 и α- и β - рецепторов приводит к вазоконстрикции, а воздействие только на β – рецепторы - стимулирует выброс оксида азота и простациклина, приводящие к вазодилатации.

Эндотелин - 1 представляет собой прямой активатор лейкоцитов. Он способен увеличивать пролиферацию гладкомышечных клеток путем увеличения (в 3 - 10 раз) свободных митогенных факторов, а также ослабления прямого митогенного действия. Воздействие эндотелина на тромбоциты опосредовано через уменьшение выработки вазорелаксантов оксида азота и простациклина, а также путем увеличения высвобождения тканевого активатора плазминогена, фактора активации тромбоцитов. Эндотелин - 1 - однин из медиаторов многих патологических состояний.

Изучая этиологию патогенеза варикозного нарушения вен, нельзя не отметить их многогранность и сложность. Так, эндотелий может вырабатывать поливалентные, локально воздействующие вещества, модулирующие функции остальных клеток системы крови и венозной стенки, активно участвует в регуляции сосудистого гомеостаза. Для эндотелиальных клеток характерен высокий уровень метаболизма, они чувствительны к любым изменениям состава крови, в особенности касающимся насыщения ее кислородом.

Большое внимание в развитии патологического состояния вен уделяют эндотелиальной дисфункции [М.В. Покровский и др., 2011; Т.В. Орлова и др., 2012]. При снижении скорости кровотока в венах, возникновении турбулентных потоков, а также под воздействием гипоксии происходит изменение в системе регуляции сосудистого тонуса за счет выработки эндотелием биологически активных веществ. Выработка простациклина с антиагрегантными свойствами уменьшается, а эндотелина-1 возрастает. Изменения также касаются и продукции простаноидов с увеличением продуцирования тромбоксана А2 и простагландина Е2 с проагрегантными противовоспалительными свойствами. В результате увеличивается агрегация тромбоцитов и адгезия лейкоцитов, активируется система свертывания крови, иммунокомпетентные клетки мигрируют в соединительнотканный матрикс, запуская процессы воспаления. Все это протекает на фоне вазоконстрикции [Афанасьева Г.В. и соавт. 1999; Hohmann C.D. et al., 2018].

При остром повреждении вен такая реакция вполне оправдана и направлена на остановку кровотечения и регенерацию дефектов сосудистой стенки. Однако при развитии варикозной болезни на фоне обозначенных выше факторов, дисбаланс регуляции приобретает патологический характер, что сопровождается постоянным воспалением, приводящим к гиперпролиферации клеток соединительной ткани, повышению выработки коллагена и фиброзу сосудистой стенки.

Определяющую роль при патологических изменениях сосудистой стенки в случае хронической венозной недостаточности (ХВН) отводится факторам роста — полипептидным химическим агентам, продуцирующимся in situ клетками стенки сосуда (эндотелиальными, гладкомышечными клетками) и клетками крови (тромбоцитами, лейкоцитами) [Chabrier P.E., 1995; Schmid - Schonbein G.W., 2001; Coleridge Smith P.O., 2001]. Факторы роста (PDGF — фактор роста тромбоцитарного происхождения, FGF - фактор роста фибробластов, TGFβ -фактор роста тромбоцитов, VEGF - сосудисто-эндотелиальный фактор роста и др.) способны действовать как агенты «компетентности», повышая пролиферативную активность клеток - мишеней, или как агенты «прогрессии», стимулируя синтетическую деятельность компетентных клеток. Клеточная миграция, пролиферация и биосинтез или распад межклеточного вещества приводят к структурным изменениям венозной стенки. Изменяется соотношение коллагеновых и эластических волокон, эластичность сосудистой стенки уменьшается, что является предиктором развития варикозной болезни.

Низкомолекулярная фракция ЭМП обеспечивает выраженные антигипоксические свойства экстракта в случаях как внутрибрюшного, так и per os введения крысам.

Изучение выживаемости животных после 4-х минутного их нахождения на высоте 12 000 м, обнаружено, что по сравнению с контрольной группой, где выжило 14,3 % животных, в группе крыс, получавших ЭМП, выжило 57,1 % животных.

При определении времени остановки дыхания на экстремальной высоте 12 000 м (время жизни) определяется, что время жизни в испытуемых опытной группы достоверно увеличивается в 2,4-2,6 раза, в то время как в контрольной группе оно остается неизменным.

Анализ устойчивости в случае экстремальной гипоксии обнаружил, что время жизни после per os введения пиявита увеличилось в 1,5 раза.

ЭМП обладает способностью блокировать активность протеолитических ферментов. Так, экстракт пиявита при концентрации белка 5,6 мг/мл блокирует казеинолитическую активность альфа-химотрипсина на 27±6,3%, субтилизина на 66,7±9%, трипсина на 78,12%. ЭМП дозозависимым образом блокирует амидолитическую активность фактора XIIa и амидолитическую активность калликреина плазмы крови. При концентрации белка 11,5 мг/мл ЭМП ингибирует амидолитическую активность эластазы гранулоцитов человека на 71,2% [И.П. Баскова, 1986].

Противовоспалительный эффект ССЖ определяется действием биологически активных веществ, содержащихся в нем.

К числу таких веществ можно отнести стабильный аналог простациклина, который способен к нормализации нарушений при патологических состояниях системы циклических нуклеотидов и препятствующего высвобождению медиаторов воспаления, таких как, серотонина, брадикинина и метаболитов арахидоновой кислоты из тромбоцитов.

Способность подавлять образование кининов, мощных медиаторов воспаления, направленного действия ингибиторов калликреина плазмы крови.

Обеспечение увеличения фагоцитарной активности нейтрофилов с участием компонентов системы комплемента, на которые направленное действие оказывают специфические биологически активные соединения ССЖ, также представляет один из важнейших механизмов противовоспалительного действия.

Доказано, что ССЖ обладает антикомплементарной способностью по классическому и альтернативному путям активации, то есть может обеспечить связывание с компонентами обоих путей активации комплемента [И.П. Баскова и соавт., 1988]. Из экстракта МП выделен белок с молекулярной массой 67 кДа, ингибирующий активность фермента Cls, субкомпонента комплемента C1 [О.А. Тихоненко, 2000]. Известно, что Cls связывается с комплементфиксирующими участками антител (IgG и IgM) на поверхности клетки, что инициирует активацию системы комплемента. Кроме того, могут происходить также активация и потребление других компонентов системы комплемента, обеспечивающих иммуностимулирующее действие.

Таким образом, применение препаратов на основе ЭМП при сосудистых заболеваниях различной этиологии представляется вполне оправданным за счет противовоспалительного, антипролиферативного, противотромботического и антигипоксического эффектов, которые могут корректировать нарушения в системе эндотелий - сосудистая стенка, профилактировать развитие и прогрессирование варикозной болезни за счет нормализации выработки биологически активных веществ эндотелием, тромбоцитами и лейкоцитами, снижения агрегации и адгезии клеток к эндотелию, воздействия на пролиферацию клеток сосудов и синтез коллагена. Антигипоксическое и антипролиферативное действие также может способствовать повышению чувствительности клеток венозной стенки к гипоксии, опосредованно снижая выработку факторов роста.

1.4. Лечение трофических язв нижних конечностей и ожоговых травм

Вопрос-проблема трофических язв до сих пор не утратил своей актуальности. Многомиллионное количество людей по всему миру страдают хроническими трофическими язвами стоп и голеней [А.Ю. Токмакова, 2008]. В среднем, по данным разных достоверных источников, трофические язвы венозной этиологии составляют около 70% всех язв нижних конечностей. Облитерирующий атеросклероз является причиной развития трофических язв нижних конечностей в 8-9% случаев. Диабетическая микро- и макроангиопатии, а также дистальная нейропатия являются причинами трофических язв в 3-4% случаев, а среди больных сахарным диабетом лица, имеющие язвенные дефекты стоп, достигают 16%. Также наблюдается малигнизация трофических язв - в 1,6–3,5 % случаев.

Этиологическими причинами трофических язв по данным Савельева В.С. (2001) являются (в % соотношении): варикозные – 52 %, артериальные – 14%; смешанные – 13%, посттромбофлебитические – 7%, посттравматические – 6%, диабетические – 5%, нейротрофические – 1% и прочие – 2%.

Патогенетические причины трофических язв можно определить в виде пирамиды, вершиной которой является тяжелый раневой сепсис и синдром полиорганной дисфункции, а в ее основании –врожденные и приобретенные заболевания и травмы, запускающие различные патологические процессы на тканевом (ишемия, гипоксия), микроциркуляторном (тромбозы и сладж-форменные элементы крови, экстравазация белка в перивазальное пространство с концентрацией фибрина в тканях и с формированием «фибриновых сгустков» вокруг капилляров, что ухудшает метаболические нарушения в тканях, стимулируя эпидермальный некроз) и клеточном (активизация лейкоцитов с выработкой ими лизосомальных ферментов) уровнях [Rothenberger J. et al., 2016; Shakouri A. et al., 2018].

Также, присутствуют локальные и системные сдвиги, формирующие синдром увеличенной вязкости кровотока. Ответом на выраженную локальную гипоксию тканей в области трофической венозной язвы является активация процессов свободнорадикального перекисного окисления липидов, приводящее к системному истощению и развитию цитокин-опосредованного повреждающего воздействия тканей дистальных сегментов конечности. Результатом этого происходит возникновение первичного аффекта, нарушается барьерная функция кожи. Повреждение слоев кожи сопровождается некрозом мягких тканей и выраженным экссудативным процессом. Следующим этапом происходит бактериальная контаминация трофической язвы, которая в ряде случаев способная приобретать генерализованный характер [Hohmann C.D. et al., 2018; Wang H. et al., 2018].

Трофические язвы нижних конечностей представляют собой следствие различных заболеваний, нарушающих локальную гемодинамику артериальной, венозной, лимфатической систем, включая микроциркуляторный уровень нарушения. Помимо перечисленных факторов, причиной возникновения трофических язв могут быть различные травматические повреждения кожи, мягких тканей и периферических нервов.

Терапия трофических язв является сложной задачей и включает в себя комплекс мероприятий оперативного и консервативного (местных и системных) характера.

Определение перевязочного средства требует уточнения фазы раневого процесса и степени экссудации. Так, повязки, которые возможны к использованию в фазу воспаления, благодаря структуре материала могут инактивировать раневой экссудат, направляют к необратимой элиминации микроорганизмов, токсинов и тканевого детрита, способствуя при этом к отторжению некротизированной ткани.

Для первой фазы раневого процесса приемлемо использование не только антисептиков и протеолитических ферментов, но и сорбентов. Для второй и третьей фазы, с целью увеличения скорости пролиферации и регенерации тканей на фоне антимикробного действия целесообразно использовать средства, стимулирующие регенераторные процессы.

Кристаллическая форма протеолитических ферментов, трипсина и химотрипсина, не смогла найти своего широкого применения в терапии – они активны лишь во влажной среде при фиксированном значении pH=6 [Torrance C., 1985; Taylor S. et al., 1986; Stuck J., 1995], расщепляя компоненты раневого экссудата и не оказывая никакого воздействия на коллаген, а также нарушают структуру компонентов регенерирующего соединительнотканного матрикса [Хохлов А.М., 1989; Васютков В.Я. и соавт., 1993].

В качестве симптоматического лечения при ХВН применяют местные лекарственные препараты, в состав которых входят флеботропные агенты и гепарин [Flanga V., 2002]. Эффективность лекарственных препаратов локального действия в значительной степени зависит от концентрации действующего вещества. Гепарин в концентрации не менее 500МЕ в 1г. оказывает противовоспалительное и анальгезирующее действия за счет инактивации гистамина и гиалуронидазы, а также обеспечивает антитромботический эффект. Гели, содержащие 1000МЕ гепарина в 1г., демонстрируют более выраженный терапевтический эффект.

Можно предположить, что аналогичным действием будут обладать компоненты ЭМП. Анитромботическое и антиагрегантное действия ЭМП, описанные нами выше, безусловно, должны благоприятно воздействовать на микроциркуляторное русло в очаге поражения. Кроме того, благоприятной в первую фазу может быть противовоспалительная и анальгезирующая активность, реализуемая за счет инактивации калликреина, брадикинина, серотонина и системы комплемента.

Известно, что из ЭМП выделен белок с молекулярной массой 67 кДа, ингибирующий активность фермента Cls, субкомпонента комплемента C1

[Тихоненко О.А., 2000]. Так, Cls связывается с комплементфиксирующими участками антител (IgG и IgM) на поверхности клетки, что инициирует активацию системы комплемента. Предполагается, что ингибирование ССЖ активации системы комплемента является проявлением защитной функции МП, предохраняющей ее симбиотическую микрофлору (Aeromonas) от литического воздействия комплемента.

Увеличение фагоцитарной активности нейтрофилов с участием компонентов системы комплемента, на которые оказывают воздействие специфические биологически активные соединения ССЖ, является одним из важнейших механизмов противовоспалительного действия. Как уже отмечали, ССЖ обладает антикомлементарной способностью по классическому и альтернативному путям активации, т.е. может связываться с компонентами обоих путей активации комплемента.

Кроме того, благоприятное воздействие на репаративные процессы в язвах ЭМП может оказать за счет входящей в его состав коллагеназы.

Коллагеназа представляет собой водорастворимый фермент, который может избирательно расщеплять лишенный мукополисахаридного футляра коллаген на границе активных и девитализированных тканей, которые быстро и атравматично отделяются от раневого пространства. Коллагеназа не повреждает компоненты соединительнотканного матрикса, способна к увеличению пролиферации кератиноцитов почти в 10 раз. Коллагеназа входит в состав некоторых местных препаратов, например, мази «Ируксол» («Smith&Nephew»), широко применяемой в терапии трофических язв [Липницкий М.Е. с соавт., 2001].

По данным ВОЗ на долю термических поражений приходится 4-6% от всех травм мирного времени [Алексеев А.А., 1999; Saner D., Riedeberger J., Bohland W. et al., 2005]. В США ежегодно от 500000 до 700000 человек получают ожоги, приблизительно 45 000 обожженных по своей тяжести требуют госпитализации и около 3500 случаев заканчиваются летальным исходом [Ryan C.M., 1998; Herndon D.N., 2010]. В России ежегодно регистрируется более 500 000 случаев термической травмы. Анализ частоты и структуры ожоговой травмы взрослого населения в регионах Российской Федерации свидетельствует, что в большинстве субъектов показатели ожогового травматизма за последнее десятилетие существенно не изменились. Этиология наиболее распространенных видов поражения являются термические ожоги, которые составляют до 90-95% всех ожогов, доля химических ожогов составляет от 2,5 до 5,1%, ожоги от электротравмы встречаются в 1-2,5% случаев [Van Rijn O.J., 1989; Азолов В.В., 2004].

Около 70% пациентов получают ограниченные по площади и не глубокие ожоги. Помощь они получают амбулаторно. Пациенты с ожогами, госпитализированные в стационары, в 60-80% случаев также имеют поверхностные и пограничные ожоги II-IIIA степеней, не требующие оперативного лечения. Однако, ожоги во многом определяют тяжесть травматического повреждения и его прогноз. В частности, исход ожога зависит не только от площади глубоких повреждений, но и от всей пораженной области. Данное положение, закреплено в виде универсального прогностического теста (индекс Франка), определяющего тяжесть и исход ожоговой болезни [Герасимова Л.И. с соавт., 1996; Jha K. et al., 2015; Butt A.M. et al., 2016].

Экспериментальное исследование Клячкина Л.М. и Пинчука В.М. (1969г.), свидетельствует, что ожоговая травма не является "стабильным" образованием и её углубление может быть связанно с расстройствами кровообращения, в частности, с капиллярными застоями, вызывающими аноксию тканей с их последующей некротизацией. Продолжительный стаз в сосочковом слое и вокруг придатков кожи может приводить к некрозу росткового слоя эпидермиса и эпителиальных придатков кожи. Это может привести к существенному углублению ожогов IIIA степени.

Большинства клиницистов придерживается мнения, что пограничные ожоговые травмы IIIA степени хоть и могут заживать самостоятельно, но сохраняющиеся эпидермальные придатки находятся под «страхом» гибели. Данный процесс самостоятельного заживления в случае обширных ожоговых травм может длиться до 31-37 дней. При этом почти 1/3 ожогов IIIA степени заживают, с образвозанием гипертрофических и келлоидных рубцов, которые в последствие требуют продолжительного консервативного и оперативного лечения [Варес А. Ю, 1981].

Изложенные выше факты объясняют, что местная терапия ожоговых травм играет важное значение в обеспечении неосложнённого течения ожогов и ожоговой болезни. Основной задачей в терапии поверхностных термических ожогов, в частности IIIA степени, является избегание системного и локального развития ишемии, гипоксии, создать оптимальные условия для раннего заживления ран. Любая нерациональная терапия способствует замедлению регенераторных процессов. В случаях обширных ожоговых поражениях в результате неадекватного или запоздалого противошокового лечения, отсроченного восстановления микроциркуляции, ожоги II-IIIA степени могут углубляться. Это также может случаться и при нерациональной местной терапии в связи с развитием выраженного экссудативного процесса на фоне инфекционного процесса. Также, в случае сочетания обширных пограничных ожогов IIIA степени с глубокими ожогами IIIБ - IV степени заживление пограничных ожогов на фоне тяжёлой ожоговой болезни часто "затягивается" по времени. Повышается риск генерализации инфекции, значительно ухудшается прогноз и результаты лечения термической травмы.

Сегодняшняя тактика лечения ожоговых травм разработана, благодаря успехам в изучении патогенеза ожоговой болезни и её осложнений.

Широкие возможности открыли исследования, направленные на выявление механизмов взаимодействия между организмом пострадавшего от ожогов и инфекцией. Важнейшее значение принадлежит исследованиям метаболизма при обширных ожогах. Особое место занимает изучение течения раневого процесса на современном уровне в зависимости от тяжести ожоговой травмы, применения различных, в т.ч. альтернативных методов лечения.

На фармакологическом рынке Российской Федерации в настоящее время представлен широкий спектр противоожоговых средств как отечественного, так и зарубежного производства.

Обилие препаратов и разнообразие их форм усложняет их систематизацию и классификацию. Кроме того, появилось немало многокомпонентных препаратов, обладающих комбинированными лечебными свойствами [Алексеев А.А., Бобровников А.Э., 2009; Никонов Г.И. и соавт., 2016].

Потенциально, препараты на основе ЭМП могут быть использованы в составе комплексной терапии ожогов, поскольку они обладают противовоспалительной и анальгезирующей активностью. Поскольку нарастание глубины и площади ожога опосредовано нарушением микроциркуляции, компоненты ССЖ (за счет антиагрегантных и антикоагулянтных свойств) могут способствовать нормализации процессов в ране и уменьшению зоны поражения. В качестве лекарственной формы может быть использовано раневое покрытие, гель или мазь. Следует отметить, что применение того или иного средства на открытых ранах возможно только при условии соблюдения стерильности и минимальной аллергенной активности агента.

1.5 Нейротрофический, иммуномодулирующий и антипролиферативный эффекты

Предположение о существовании нейротрофических свойств некоторых компонентов ССЖ медицинских пиявок основано на двух определяющих моментах.

Во-первых, имеется немало указаний на частичное или полное восстановление функций, утраченных в последствии органического поражения нервной ткани, после лечения медицинскими пиявками некоторых заболеваний (миопатии: синдром бокового амиотрофического склероза, миопатия Ландузи-Дежерина, миопатия Беккера; рассеянный склероз; сенсоневральная тугоухость.

Во-вторых, наличие в секрете обилия протеаз и ингибиторов протеаз в сочетании с данными, согласно которым белки со свойствами протеаз и ингибиторы протеаз могут обладать нейроростковым влиянием на нейроны, делает возможным предположить существование нейротрофических свойств некоторых компонентов, входящих в секрет слюнных желез.

Проведенные Н.И. Чалисовой с соавт. (1999) исследования подтвердили это предположение – ЭМП, представляющий собой комплекс биологически активных веществ, продуцируемых медицинскими пиявками, является активным нейростимулирующим агентом, причем оказывающий четкий дозозависимый эффект. Эта способность ССЖ реализуется и в ЭМП при анализе его влияния на рост спинальных ганглиев куриных эмбрионов в культуре этой ткани. При конечной концентрации белка водного экстракта ЭМП 200 нг на 1 мл культуральной среды выявлен статистически достоверный по сравнению с контролем нейритстимулирующий эффект. Он выражается в том, что индексы площади экспериментальных эксплантатов выше, чем контрольных эксплантатов [Н.И. Чалисова, С.Г. Журавский, В.А. Пенияйнен с соавт., 1999].

Установлена возможность положительного влияния ЭМП на память крыс. Одним из направлений в изучении молекулярных механизмов индивидуально приобретенной памяти являются работы, посвященные анализу изменений ДНК при ее метилировании [Б.Ф. Ванюшин, Н.А. Тушмалова, Л.В. Гуськова, 1974].

Л.Л. Прагиной с соавт. (1999); было изучено влияние ЭМП, содержащего ССЖ, на условно-рефлекторную память крыс при внутрибрюшинном и внутрижелудочном способах введения. Моделью индивидуально приобретенной памяти у животных (накопление, сохранение и воспроизведение информации) служили условные рефлексы пассивного избегания. Критерием запоминания был латентный период (ЛП) захода в темный отсек камеры, где животные получали электрораздражение. После облучения у крыс, получавших трехразовые внутрибрюшинные инъекции экстракта ЭМП один раз в сутки (50 мг/кг массы тела), через 24 часа после последней инъекции обнаружено сохранение памятного следа. По сравнению с контрольной группой животных это выражалось в удлинении на 40 с ЛП захода в темный отсек камеры [Л.Л. Прагина, Н.А. Тушмалова, И.П. Баскова, Л.Л. Завалова, 1999; Н.А. Тушмалова, Л.Л. Прагина, И.П. Баскова с соавт., 2001]. При пероральном (внутрижелудочном) введении суспензии ЭМП в физиологическом растворе в количестве 150 мг на 1 кг массы тела также в течение 3 дней был достигнут положительный результат [Л.Л. Прагина и др., 1999; Н.А. Тушмалова с соавт., 2001].

Экспериментально установленный факт положительного влияния ЭМП на память крыс может быть объяснен способностью ССЖ стимулировать метилирование ДНК, подобно тому, что было обнаружено при перфузии печени крыс ССЖ. Однако поскольку в данной серии экспериментов не определялась степень метилирования ДНК ткани мозга животных, это объяснение пока остается на уровне гипотезы. Важно отметить, что существенная роль в обучении и явлениях памяти у крыс принадлежит нейротрофическому фактору мозга [J.S. Mu, W.P. Li, X.F. Zhou, 1999]. В связи с этим представляется заслуживающим внимания установленный статистически достоверный нейритстимулирующий эффект ЭМП в отношении спинальных ганглиев куриных эмбрионов [Н.И. Чалисова и соавт., 1999]. Гипотезы, предлагаемые для объяснения полученных экспериментальных результатов, основываются на непреложном факте проникновения биологически активных компонентов ЭМП через гематоэнцефалический барьер. Косвенным свидетельством такой возможности являются результаты анальгезирующего действия ЭМП при интраназальном введении крысам [С. Халиль, 1987] и данные экспериментов, показавшие статистически достоверное накопление 3Н-радиоактивной метки в ткани мозга при пероральном введении крысам меченого тритием ЭМП [Н.Г. Котлова с соавт., 1999].

При изучении влияния ЭМП на систему иммунитета в экспериментах была выявлена его способность подавлять пролиферацию лимфобластоидных клеток (штамм МТ4) и мононуклеарных клеток периферической крови, стимулированных ФГА (фитогемоагглютинином). ЭМП проявляет выраженное антипролиферативное действие при концентрации белка в диапазоне от 100 до 500 мкг/мл в отношении культур клеток обоих типов. Максимальная способность ЭМП подавлять пролиферацию клеток составляет 80 % по отношению к контролю. Антипролиферативное действие ЭМП снимается интерлейкином 2. Иммуносупрессорные свойства метилпреднизалона (конц. 10^{-8} М) и циклоспорина (конц. $0{,}1^{-10}$ нг/мл) усиливаются в присутствии ЭМП.

Иммунотоксическое действие ЭМП было изучено в 1988 году в лаборатории иммунотоксикологии и аллергенности (зав. к.б.н. Кудрина Г.П.) Всесоюзного научного центра безопасности биологически активных веществ (г. Старая Купавна) с целью обоснования безопасности его применения в соответствии с требованиями Фармакологического комитета МЗ СССР [Г.П. Кудрина, Т.В. Гневковская, 1992]. Были использованы методы, позволяющие оценить влияние ЭМП на Т- и В-клеточное звенья иммунной системы: реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к эритроцитам барана, реакция прямой гемагглютинации (РПГА), количество разеткообразующих клеток (РОК) и число антителообразующих клеток (АОК).

Показано, что ЭМП усиливает реакцию ГЗТ к эритроцитам барана у иммунизированных мышей, проявляя иммуностимулирующее действие на Т-клеточное звено иммунной системы и снижает РОК в селезенке иммунизированных мышей, что свидетельствует об иммуносупрессорном действии пиявита на В-клеточный иммунный ответ. На основании этих данных можно говорить об иммуномодулирующем действии ЭМП при введениях животным.

Иммуносупрессорное действие водного ЭМП продемонстрировано на культуре лимфобластоидной линии клеток МТ4 и мононуклеарных клеток периферической крови человека (МКПК), стимулированных митогеном (фитогемоагглютинином, ФГА), по снижению их пролиферативной активности, которая оценивалась по включению 3Н-тимидина. Выраженная антипролиферативная активность ЭМП выявлена в диапазоне концентраций белка 100-500 мкг/мл, максимальное проявление этой активности составляет 80% [F.S. Baranova, LP. Baskova, A.T. Baranov, 1998; Ф.С. Баранова, И.П. Баскова, Е.А. Калашникова, 1999].

Следует обратить внимание на то, что ЭМП повышают чувствительность МКПК к действию субоптимальных концентраций глюкокортикоидов, метилпреднизолона (10^{-8}М) и циклоспорина (0,15 нг/мл), известных иммуносупрессоров, используемых в клинике. Из рисунка четко прослеживается зависимость потенцирующего эффекта пиявита от его концентрации [Ф.С. Баранова, И.П. Баскова, Е.А. Калашникова, 1999; Е.А. Калашникова с соавт., 1999].

Представленные данные свидетельствуют об иммуносупрессорной и противовоспалительной активности ЭМП. Возможно, одним из носителей такой активности является его компонент, эглин.

Диализат ЭМП обладает более выраженной фагоцитарной активностью по сравнению с исходным экстрактом. Возможно, что содержащиеся в экстракте недиализируемые примеси экранируют проявление фагоцитарной активности ЭМП. Подобный эффект проявляется при разведении экстракта физиологическим раствором. С разведением, активность его повышается.

Настоящие результаты представляют собой развитие существовавших ранее представлений о том, что насосанная пиявкой кровь обладает повышенной фагоцитарной активностью, а кровь больных, принимающих сеансы ГТ, обладает повышенной (в 2-3 раза) фагоцитарной активностью по сравнению с исходным уровнем.

1.6 Трансэпидермальное прохождение активных компонентов экстракта пиявки медицинской

Компоненты экстракта пиявки медицинской обладают способностью трансэпидермальной диффузии биологически активных веществ. Это объясняется использованием липосом, которые образованы полярными молекулами и имеют вид мицелл, внутри которых и находятся активные вещества. В ряду биологически активных веществ, продуцируемых медицинскими пиявками, есть и природная липосома — дестабилазный комплекс. Полярной молекулой здесь является фермент дестабилаза ε-(γ-Glu)-Lys изопептидаза. Фермент, осуществляет и тромболитическую активность посредством гидролиза изопептидных связей. Исследования показали, что дестабилаза эти свойства проявляет как в органических растворителях, так и в водной среде [Баскова И.П., 1986; Ya. A. Alexandrovski, 1992]. Это свойство дестабилазы является важным, так как если роговой слой эпидермиса имеет липидную (жировую) прослойку, то в следующем за ним слое дермы большую роль играет водная фаза. Липосома, образованная дестабилазой, представляет собой прочный комплекс, содержащий дестабилазный и простагландиновый компоненты, гирудин и ингибитор калликреина плазмы крови. Природная липосома медицинских пиявок позволяет косметическим средствам влиять не только на эпидермис, проникновение в который и через который происходит по липидным слоям, но и на дерму. В дерме липосома проникает в клетки кожи трансмембранным способом, то есть, последовательно встраиваясь в слой клеточной мембраны. Вся дерма пронизана тончайшими кровеносными и лимфатическими сосудами. Кровь, протекающая по сосудам, просвечивает сквозь эпидермис и придает коже розовый оттенок. Из кровеносных сосудов в дерму поступают влага и питательные вещества. Влага захватывается гигроскопичными молекулами — белками и гликозаминогликанами, которые при этом переходят в гелевую форму. Часть влаги поднимается в эпидермис и потом испаряется с поверхности кожи. Кровеносных сосудов в эпидермисе нет, поэтому влага и питательные вещества медленно просачиваются в эпидермис из дермы. Действие дестабилазного комплекса приводит к улучшению микроциркуляции крови в капиллярах и улучшению питания дермы, насыщению ее влагой, к интенсификации метаболических процессов, что сказывается на состоянии кожи в целом. Эти же процессы, растянутые во времени, положительно влияют и на эпидермис. Таким образом, действие дестабилазного комплекса, улучшающего микроциркуляцию крови, благотворно сказывается на состоянии кожи и на ее внешнем виде [Баскова И.П., 1986; Никонов Г.И. и соавт., 1998].

Комплекс биологически активных компонентов, продуцируемых медицинскими пиявками, не ограничивается лишь природной липосомой, в его составе есть и фермент — гиалуронидаза. Этот фермент является фактором, способствующим транспортировке в кожу активных веществ за счет увеличения проницаемости межклеточного вещества, тканей, стенок капилляров в результате деполимеризации и гиалуроновой кислоты (гликозамингликан).

Гиалуроновая кислота — основа межклеточного вещества кожи, которая скрепляет тканевые элементы и клетки.

1.7 Препараты на основе экстракта пиявки медицинской

Первый и на сегодняшний день единственный препарат из медицинской пиявки, зарегистрированный на территории РФ, носит название пиявит. Он представляет собой лиофилизированный аморфный порошок ЭМП, помещенный в желатиновые капсулы. Препарат разрабатывался на базе биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова. пиявит разрешен к медицинскому применению в 1994 году Минздравмедпромом РФ (рег. № 94/302/6 и перерегистрирован в 2001 году; № 211-6940-6).

В качестве основы препарата используется экстракт цельной пиявки, а не головной ее области, содержащей секрет слюнных желез, поскольку известно, что ингибиторы протеиназ, такие как эглины и бделлины, секретируются стенкой кишечного канала МП [P. Ascenzi et al., 1995]. Кроме того, по данным U. Seemuller, J. Dodt, E. Fink, H. Fritz (1986), одна пиявка содержит примерно 20 мкг эглина, который концентрируется в кровяных лакунах, половых органах, нефридиях и в слизи животного.

Вопрос всасывания из кишечника в кровь биологически активных соединений был объяснен в результатах многочисленных экспериментов на животных, свидетельствующих о способности самого секрета слюнных желез оказывать эффект при пероральном введении. На основе этих опытов и было высказано предположение о липосомной природе секрета, что обеспечивает не только защиту содержащихся в липосоме белков от протеолиза ферментами желудочно-кишечного тракта, но и ее проникновение в кровь через стенку кишечника путем пиноцитоза [Баскова И.П., 1986].

Поскольку пиявит является поликомпонентным лекарственным препаратом, его фармакокинетику возможно представить только относительно поведения некоторых составляющих его компонентов. Введение 3Н метки непосредственно в пиявит методом термической активации трития обеспечивало равномерное ее распределение среди компонентов препарата. Такой препарат в виде водного экстракта с радиоактивностью 90 мкК и вводился внутрижелудочно крысам [Н.Г. Котлова и соавт., 1999]. Показано, что тритий обнаруживается в мышечной ткани и проникает в мозг через гематоэнцефалический барьер. Спустя 3 часа после введения радиоактивность мозга была выше, чем радиоактивность крови. Эти результаты с достоверностью указывают на то, что компоненты пиявита всасываются из кишечника в кровь, однако для изучения поведения высокомолекулярных составляющих препарата требуются дополнительные исследования [Котлова Н.Г. и соавт., 1999].

Для сравнения анализировали поведение меченого тритием эглина с (мол. масса 7000 Да), одного из компонентов пиявита, также спустя 3 часа после перорального введения крысам. Максимальное накопление эглина С было зафиксировано в почках. Накопление в тканях полой вены, сердца и аорты было в 5 раз ниже, чем в почках. Наименьшее из достоверных отличий от контроля выявлено в ткани мозга [Котлова Н.Г. с соавт., 1999]. В то же время из данных литературы известно, что после внутривенного введения грызунам и свинкам эглин С быстро выводится почками, время его полужизни 10 мин и 2 часа, соответственно [P. Ascenzi et al., 1995]. По всей вероятности, время полужизни компонентов пиявита различно и определяется их свойствами.

Кроме эглина, детально охарактеризован гирудин и показано, что примерно через 1 час после капельного внутривенного введения до 80% этого низкомолекулярного белка выводится с мочой в неизмененном состоянии. Медленное тромболитическое действие пиявита связано с продолжительным пребыванием компонентов пиявита или их метаболитов в циркуляции.

Механизм действия ЭМП принципиально отличается от механизма действия секрета слюнных желез медицинской пиявки при гирудотерапии. Его действие не сопровождается рефлекторным актом, который сопутствует инъецированию секрета слюнных желез пиявкой при гирудотерапии. Он не оказывает непосредственного воздействия на микроциркуляторное русло кожи как секрет слюнных желез, но его компоненты, попадающие в циркуляцию из кишечника, опосредовано влияют на различные системы организма, в том числе и на микроциркуляцию [Баскова И.П., Бородин В.Г., Селезнев К.Г., 1990].

Первоначально пиявит был разрешен Фармакологическим комитетом Минздрава России как средство для профилактики и лечения тромбофлебитов поверхностных вен, а сам препарат расценивался как непрямой антикоагулянт, но со временем спектр его применения расширился.

Данных о зарегистрированных местных лекарственных препаратах на основе ЭМП как в России, так и за рубежом, нет. В то же время, имеется большое количество косметических средств (кремов, мазей, гелей), содержащих ЭМП.

В России широко известна продукция ЗАО «Биокон» (Донецк, Украина), включающая линию косметических средств на основе ЭМП (http://www.biokon.ru/catalog/hirudoactive/). Однако, каких-либо данных о проводимых исследованиях, подтверждающих эффективность, нет.

Аналогичная ситуация наблюдается и в отношении других косметических продуктов. Выводы об их лечебных свойствах делаются на основе полезности гирудотерапии как таковой, что принимается как должное. При этом не проводилось изучение эквивалентности лечения пиявками и местными средствами на основе ЭМП.

Другим производителем кремов на основе ЭМП является украинская компания ООО «Эликсир», выпускающая крем-бальзам «Активен» с экстрактом медицинской пиявки. Крем обладает противовоспалительным действием, ингибируя образование продуктов, сопровождающих воспаление, уменьшает болевые ощущения и чувство тяжести в ногах, укрепляет сосудистые стенки и препятствует тромбообразованию, способствует укреплению стенок сосудов, улучшает кровообращение в месте нанесения, уменьшает ломкость капилляров (http://eliksir.dp.ua/profilaktika-zabolevanij-sosudov).

Среди российских производителей косметики известно ООО "Фора-Фарм", предлагающее крем для ног «Софья» с ЭМП. В состав кремы входят: вода, обогащенная ионами серебра, воск пчелиный, экстракт медицинской пиявки, масло облепиховое, масло оливковое, масло зародышей пшеницы, масляные экстракты:

ромашки, каштана конского, шиповника, крапивы, лопуха, череды, фукуса, водноспиртовые экстракты: хвоща, лесного ореха, алоэ вера, витамины А и Е, витанол, D-пантенол, гидролизат коллагена, консерванты. Применение крема показано при комплексном лечении нарушений периферического кровообращения на уровне макро- и микроциркуляции, в сочетании с традиционными методами лечения, в качестве вспомогательного средства – при поверхностном флебите конечностей (воспаление вен), постинъекционном флебите. Кроме того, к показаниям к применению относят варикозное расширение вен нижних конечностей, геммороидальных вен, хроническую венозную недостаточность (усталость в ногах, тяжесть, напряжение, боли в икроножных мышцах, отечность ног, судороги), хронический посттромбофлебитный синдром, трофические язвы голени, сосудистые звёздочки, тромбофлебит поверхностных вен (http://www.golkom.ru/price/info/01184.html). Учитывая отсутствие проводимых исследований эффективности данного средства при перечисленных состояниях, правомочность определения показаний к применению не имеет фактического подтверждения.

ООО «Скимед» (Россия) производит крем-бальзам для ног «Эммовен» с жиром страуса эму и экстрактом медицинской пиявки. Показанием к применению являются симптомы хронической венозной недостаточности.

ЗАО «Твинс Тек» выпускает гель-бальзам для ног с экстрактом пиявки, предназначенный как вспомогательное средство при лечении сосудистых заболеваний ног. По данным производителя, гель оказывает венотонизирующий эффект, укрепляет сосудистую стенку, улучшает крово- и лимфообращение, способствует восстановлению прочности и эластичности сосудов, повышает тонус венозных стенок и клапанов. Снимает отечность, создает быстрый эффект свежести и снятия усталости. В состав геля входят: экстракты пиявки медицинской, конского каштана, гинго билоба, зеленого чая.

Количество зарубежных косметических средств, содержащих ЭМП, исчисляется сотнями различных продуктов. Некоторые из них представлены в таблице 1.

Таблица 1. Косметические средства зарубежного производства, содержащие ЭМП

Наименование продукта	Форма препарата	Производитель	Область применения
Hirudinol	крем	Natumin Pharma, Швеция	Заболевания вен нижних конечностей
Jelitasari	масло	Js White pearl, Малайзия	Целлюлит, мышечные боли
Cosagrande Leech Cream	крем	DMB TRADING CO., INC, США	Средство улучшения эректильной функции у мужчин
Sensaoil Skin Care	крем	Berjaya Unggul Enterprise, Малайзия	Омолаживающий крем
Leech Extract Anti-Aging Cream	крем	1. PKA Consultancy & Services, Малайзия 2. HiroCream Plus	1. Омолаживающий крем 2. Артриты, суставные боли
Cosagrande Leech Cream	крем	Herberex, США	Средство улучшения эректильной функции у мужчин

Широкий спектр наружных косметических средств с экстрактом медицинской пиявки производит компания Wing Agro Biomedic (Малайзия). Среди них крема для омоложения, купирования воспаления и болей, улучшения эректильной функции у мужчин.

Несмотря на подробное изучение свойств экстракта медицинской пиявки и разработку препаратов на его основе, экспериментальные данные с доказательными результатми эффективности их применения немногочисленны.

Таким образом, проанализированные литературные данные о наличии антитромботического, фибринолитического и противовоспалительного действия экстракта медицинской пиявки при наружном применении дают основание на возможность использования этого природного ингибитора тромбообразования в качестве фармакологического противотромботического средства, а разработка эффективных лекарственных средств на основе биологически активных соединений, продуцируемых медицинскими пиявками, исследование их фармакологической активности и возможных побочных эффектов является перспективным направлением современной фармакологии.

В ЗАО «Международный Центр Медицинской ПИЯВКИ» (Московская обл.) (ЗАО «МЦМП»), с использованием метода лиофилизации, как современного способа переработки природного сырья, получен порошок пиявки медицинской лиофилизированной, который представляет интерес в качестве перспективного источника для извлечения биологически активных веществ и разработки оригинальных препаратов для местного применения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Материалы

Эксперименты проведены на 100 мышах при изучении фармакологической активности препаратов (линий Balb/c), 120 белых мышах при изучении токсичности, самцах и самках массой 21,0±0,9 г, 320 белых крысах обоего пола, при изучении фармакологической активности исследованных образцов, и 80 крысах в токсикологическом исследовании, обоего пола массой 190±5,4г. и 40 кроликах породы Шиншилла при изучении фармакологической активности препаратов, обоего пола массой 2,5±0,5 кг.

Эксперименты выполнялись согласно методическим руководствам и нормативным документам (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96; правила и Международные рекомендации Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997); правила лабораторной практики (GLP) в Российской Федерации, утвержденные приказом Минздрава РФ от 19 июня 2003 г. № 267). Забой животных проводили с соблюдением требований, изложенных в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1997). В течение 24 часов до начала экспериментов все животные находились в условиях полной пищевой депривации со свободным доступом к воде. На момент выполнения исследований животные были здоровыми, без изменений поведения, режима сна и бодрствования, аппетита.

Исследования проведены в соответствии с политикой АО «ВНЦ БАВ» по исследованиям на животных и процедуры их проведения утверждены этической комиссией АО «ВНЦ БАВ» от 23.12.2014 протокол № 158 -2014).

Ранее на базе ЗАО «МЦМП» был разработаны нормативные документы ПР-18256912-02-06, а также ФСП-Р №001949/01-290411, в котором описаны параметры соответствия, условия контроля и производства ЭМП.

Для создания исследуемых препаратов использовались медицинские пиявки *Hirudo medicinalis*, выращенные в искусственных условиях в ЗАО «МЦМП», согласно промышленному регламенту ПР-18256912-02-06. Субстанция гирулюкс (лиофилизированный аморфный порошок от светло-серого до коричневого цвета со специфическим запахом; фармакопейная статья МЗ России 42-2384-94) получен на ЗАО «МЦМП».

Объектами исследования являлись экстракт пиявки медицинской лиофилизированной (гирулюкс) ФСП-Р №001949/01-290411, «гирулюкс, мазь для наружного применения» и «гирулюкс, гель для наружного применения» производства ЗАО «МЦМП», Россия. Мазь и гель гирулюкс 1% - от светло-серого до темно-коричневого цвета со специфическим запахом.

Состав исследуемой мази «гирулюкс, мазь для наружного применения» входят (на 100 г) и геля (на 100 г) «гирулюкс, гель для наружного применения» представлен в таблицах 2 и 3.

Таблица 2. Состав мази «гирулюкс, мазь для наружного применения» (на 100 г)

№ п/п	Компоненты	%
1	Масло вазелиновое (ГОСТ 6709-72)	15,00
2	Пропиленгликоль (Европейская ф. 2008)	5,00
3	Полисорбат-80	1,50
4	Экстакт пиявки гирулюкс (ТУ 9154-002-18256912-01)	1,00
5	Карбопол Ultrez 10 NF (ф. США 27)	0,65
6	Метилпарабен	0,30
7	Пропилпарабен	0,10
8	Триэтаноламин (Британская ф. 2008)	0,45
9	Вода очищенная (ФС 42-2619-97)	до 100,0

Таблица 3. Состав геля «гирулюкс, гель для наружного применения» (на 100 г)

№ п/п	Компоненты	%
1	Экстакт пиявки гирулюкс (ТУ 9154-002-18256912-01)	1,0 г.
2	Пропиленгликоль (Европейская ф. 2008)	5,0 г.
3	Карбопол Ultrez 10 NF (ф. США 27)	0,6 г.
4	Триэтаноламин (Британская ф. 2008)	0,5 г.
5	Метилпарагидроксибензоат (нипагин) (Европейская ф. 2008)	0,15 г.
6	Пропилпарагидроксибензоат (нипазол) (Европейская ф. 2008)	0,05 г.
7	Вода очищенная (ФС 42-2619-97)	до 100 г.
8	Экстакт пиявки НМ1 (ТУ 9154-002-18256912-01)	1,0 г.
9	Пропиленгликоль (Европейская ф. 2008)	5,0 г.

В качестве препаратов сравнения использовали мазь гепарина (Гепариновая мазь 1000 МЕ; ОАО «НИЖФАРМ», Россия), гель гепарина (Heparin-Akhrigel 1000 МЕ; Акрихин ХФК ОАО, Россия), мазь диклофенака (Ортофен, мазь 2%; ЗАО «Вертекс», Россия), гель диклофенака (Диклофенак гель 1%; ОАО «Биохимик», Россия).

Препараты сравнения применялись в тех же дозах, что и исследуемые потенциальные лекарственные средства по весу на килограмм массы тела для аналогичных экспериментальных животных. У животных контрольной группы использовали изотонический раствор натрия хлорида.

Соотношение доз: мазь, гель, раствор с ЭМП и гель диклофенак 1% в одном объеме (1г/100мл); мазь диклофенак 2% в половинном объеме, что обеспечивает в весовых единицах/кг одинаковую.

Для гепарина в 100 мл мази содержится 100 МЕ или 0,083 г гепарина, т.е. 0,083%, и использовали в том же объеме. Для гепарина (Heparin-Akhrigel 1000 МЕ; Акрихин ХФК ОАО, Россия) в 1 г содержится 1000МЕ или 0,83 г / 100 г, что составляет около 1% и предопределило его использование в той же объемной дозе, что и исследуемые препараты.

Выбор эффективных доз осуществлялся на этапе скрининга. $ЛД_{50}$ определяли на этапе токсикологических исследований для оценки токсического потенциала и соотношения токсических и терапевтических доз.

В работе дозы исследуемых мази гирулюкс 1% и геля гирулюкс 1% пересчитанные с учетом межвидового пересчета доз с человека на мышь (1 : 11), крысу (1 : 7) и кролика (1 : 3,2) составляли:

- для мышей 0,02 г (0,004 АТЕ) на мышь массой 20 г (0,2 АТЕ/кг);
- для крыс 0,09 г (0,018 АТЕ) на крысу массой 200 г (0,09 АТЕ/кг);
- для кроликов 0,54 г (0,09 АТЕ) на кролика массой 3 кг (0,03 АТЕ/кг).

Острую, подострую токсичность и местнораздражающее действие мази и геля изучали в соответствии с требованиями и инструкциями Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития [Миронов А.Н., 2012].

Субхроническую токсичность изучали на крысах-самцах массой 197-283 (средняя масса 247 г) при ежедневном в течение 30 дней накожном нанесении препарата в 1, 5 и 10-кратной от терапевтической для человека дозе с учетом межвидового переноса доз или в 7, 35 и 70-кратной без последнего – 80, 400 и 800 мг/кг.

80 мг мази или геля/кг соответствует 0.8 мг сухого экстракта гирулюкс, 400 мг мази и геля соответствует 4 мг сухого экстракта, а 800 мг - соответствует 8 мг сухого экстракта гирулюкса.

2.1 Методы исследования

Оценка противовоспалительного действия исследуемых образцов и препаратов сравнения

Местную противовоспалительную активность экстракта пиявки оценивали на модели «формалинового» отека лапы у мышей [Г.А. Шварц, Р.Д. Сюбаев., 2012]. Эксперименты выполнены с использованием мышей линии Balb/C обоего пола массой 20,2±0,4 г. Острый воспалительный отек вызывали субплантарным введением в заднюю лапу мыши 0,1 мл 2% водного раствора формалина. Выраженность отека оценивали, измеряя толщину лапки подопытного животного с помощью инженерного электронного штангенциркуля Vorel 15240 (Польша) до и через 4 часа после введения раствора формалина. Противовоспалительную активность исследуемых препаратов пиявки медицинской выражали в %% угнетения отека (рис.3).

Расчеты проводили по формулам:

$$\text{Прирост объема (\%)} = \frac{\text{объем прав.лапы} - \text{объем лев.лапы} \times 100}{\text{объем левой лапы}}$$

$$\text{Торможение (\%)} = 100 - \frac{\text{прирост объема (опыт)} \times 100}{\text{прирост объема (контроль)}}$$

Рисунок 3. Измерение толщины лапы подопытной мыши

Подопытные животные были разделены на группы (по 10 мышей в каждой группе). Первой опытной группы наносили мазь с экстрактом пиявки на подошву задней лапы с легким растиранием ежедневно в течение 10 дней до индукции острого воспалительного отека (регистрировалась первая стадия тканевых изменений); подопытным мышам второй группы – гель с экстрактом пиявки.

Оценка противовоспалительной активности препаратов пиявки медицинской у крыс на модели «фетровой» гранулемы

Эксперименты выполнены на 80 белых аутбредных крысах обоего пола массой 190-200 г [Г.А. Шварц, Р.Д. Сюбаев., 2012]. Предварительно у подопытных животных удалили волосяной покров на части кожи спины площадью не менее 2х2 см^2. Хроническое пролиферативное воспаление вызывали имплантацией под кожу медиальной части спины простерилизованных кусочков фетра массой 40±2 мг (рис.4).

Нанесение травмы при сохранении целостности кожных покровов проводили с использованием легкого эфирного наркоза. После использования местной анестезии (раствор лидокаина, 10%). Ежедневно на выстриженный участок с легким растиранием наносили исследуемый экстракт пиявки, животным контрольной группы – изотонический раствор натрия хлорида. На 8-е сутки после операции кусочки фетра с образовавшейся вокруг них грануляционной тканью извлекали, взвешивали на торсионных весах и высушивали до постоянной массы в течение 48 часов при 60°С.

Пролиферативную реакцию (ПР) оценивали по разнице между массой высушенной гранулемы ($М_{СУХ}$) и исходной массой фетра ($М_{ИСХ}$) (в мг).

Экссудативную реакцию (ЭР) оценивали по разнице между массами сырой ($М_{СВ}$) и высушенной гранулемы ($М_{СУХ}$) (в мг).

Противовоспалительное действие (влияние на пролиферативный и экссудативный компоненты воспаления) выражали в процентах по отношению к контрольной и интактной группам.

$$ПР\ (\%) = \frac{ПРконтр - ПРиссл}{ПРконтр} \qquad ЭР\ (\%) = \frac{ЭРконтр - ЭРиссл}{ЭРконтр}$$

Рисунок 4. «Фетровая» гранулема у крысы

Оценка терапевтического действия при геморрагических повреждениях (экспериментальная подкожная гематома)

Эксперименты выполнены на белых аутбредных крысах. Предварительно у подопытных животных удалили волосяной покров на части кожи спины площадью не менее 3х3 см^2. Геморагические повреждения мягких тканей вызывали путем нанесения стандартного тупого удара фиксированной силы. Нанесение травмы при сохранении целостности кожных покровов проводили с использованием местной анестезии (раствор лидокаина, 10%). На месте нанесения травмы формировался «синяк», площадь которого измеряли ежедневно. Подопытные животные были разделены на 8 групп (по 10 крыс в каждой группе). Крысам опытной группы ежедневно накожно с легким втиранием наносили гель с экстрактом пиявки до полного исчезновения гематом [Л.В. Подорольская с соавт. 2002]. Подопытным животным второй группы ежедневно накожно с легким втиранием наносили гель гепарина (рис.5). Животные контрольной группы получали изотонический раствор натрия хлорида.

Определяли время заживления повреждений (Т) и рассчитывали процент изменений по формуле:

$$\%изменений = \frac{Топ - Тконтр}{Тконтр}$$

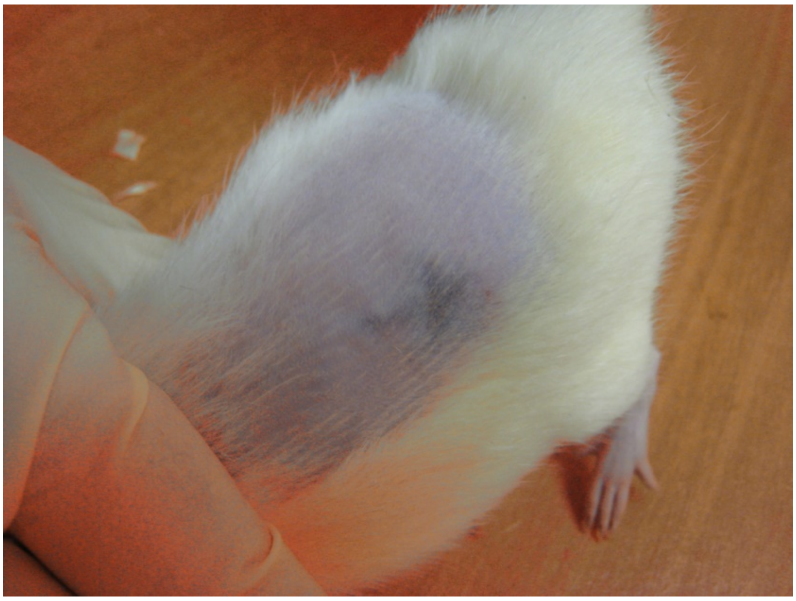

Рисунок 5. Геморрагические повреждения мягких тканей у крыс.

Оценка противовоспалительного действия при заживлении ран

Эксперименты выполнены на 80 белых аутбрендных крысах. Предварительно у подопытных животных удалили волосяной покров на части кожи спины площадью не менее 3х3 см^2. Нанесение травмы при сохранении целостности кожных покровов проводили с использованием легкого эфирного наркоза. Послойные кожные раны наносили с помощью трафарета площадью 225 мм^2 с использованием местной анестезии (раствор лидокаина, 10%; апликационно) при соблюдении правил асептики и антисептики (рис.6). Заживление кожных ран происходило открытым способом [Н.Ю. Фролова с соавт. 2009]. На кожу подопытных животных ежедневно наносили образцы, содержащие экстракт пиявки (рис.7).

Животные контрольной группы наносили изотонический раствор натрия хлорида. Наблюдения проводили до полного заживления ран.

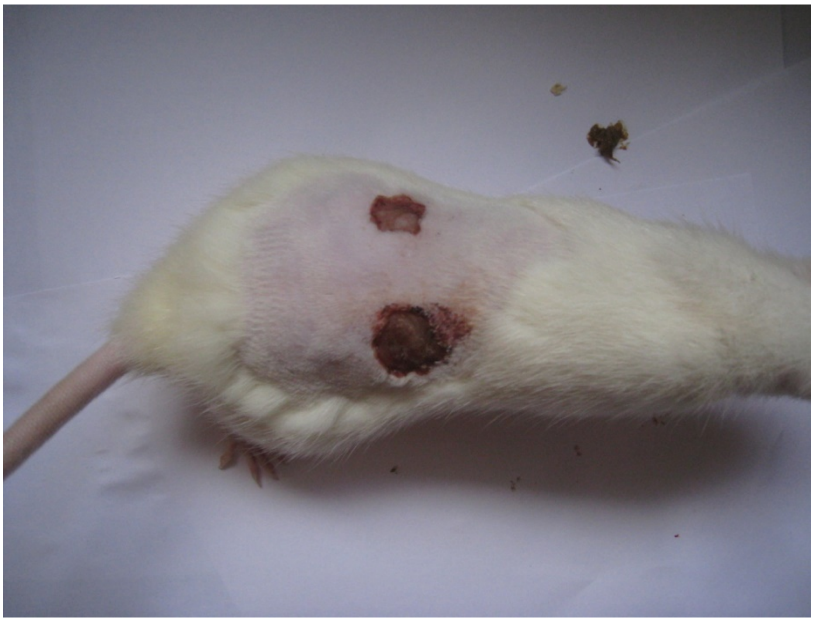

Рисунок 6. Послойные кожные раны у крыс (слева – опыт; справа - контроль)

Рисунок 7. Нанесение мази с экстрактом пиявки на послойные кожные раны у крыс (слева – опыт; справа - контроль)

Оценка противовоспалительного действия при экспериментальных ожогах

В соответствии с руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств, применяли контактный высокотемпературный способ. Ожоги спины IIIА степени у крыс вызывали прикладыванием на 10 с к предварительно депилированной коже, разогретой до 200°С медной пластины с силой 1,5 Н [Ю. Клебанова, 2005].

Об общем состоянии животных судили на основании поведенческих реакций, аппетита, массы тела, выживаемости. Наблюдение за процессом заживления ожоговых ран проводили ежедневно, а величину ожоговых дефектов измеряли несколько раз на протяжении исследования.

Эксперименты выполнены на 80 белых крысах. Предварительно у подопытных животных удалили волосяной покров на части кожи спины площадью не менее 3х3 см^2. Ожоги на кожу наносили с помощью раскаленного металического трафарета площадью 225 мм^2 с использованием местной анестезии (раствор лидокаина, 10%) при соблюдении правил асептики и антисептики. Заживление кожных ран происходило открытым способом. На кожу подопытных животных ежедневно наносили мазь экстракта пиявки и препараты сравнения.

Животным контрольной группы наносили изотонический раствор натрия хлорида. Наблюдения проводили до полного заживления ожоговой поверхности.

В течение первых минут после термического воздействия в области травмы наблюдали выраженную гиперемию кожи, границы обожженного участка были четко обозначены, отмечалась отечность кожи по периферии.

Дефекты кожи оставались открытыми на протяжении всего периода наблюдений. О темпах заживления раневых повреждений у крыс из разных групп судили, периодически снимая выкройки ран на кальку, взвешивая их или оценивая периметр (измеряют курвиметром) либо площадь раны.

На 2-е сутки после операции у нелеченых крыс поверхность дефектов кожи покрывалась тонким струпом, образованным раневым отделяемым. При взятии животных в руки корочка легко повреждалась, просачивался экссудат. Были ярко выражены признаки воспаления: края раны отличаются сильной отечностью, наблюдалось гнойное воспаление на границе с омертвевшей тканью, расплавление некротических масс. В леченых группах признаки воспаления были сглажены, особенно если испытуемое вещество обладает выраженным антиэкссудативным действием.

Оценка противосвертывающего действия

Эксперименты выполнены на 40 кроликах породы шиншилла, обоего пола массой 2,5-3 кг. До начала эксперимента у подопытных животных из краевой вены уха забирали кровь для регистрации параметров тромбоэластограммы (ТЭГ). В течение 10 дней подопытным животных наносили с легким втиранием экстракт пиявки на участок кожи с удаленным волосяным покровом площадью 2x2 см^2. Через 10 дней ежедневного накожного применения препаратов экстракта пиявки повторно регистрировали параметры тромбоэластограммы [В.А. Макаров с соавт., 2012]. Об эффективности исследованных веществ судили по изменению времени свертывания в минутах.

Острая токсичность геля и мази на основе экстракта медицинской пиявки

В опытах по определению острой токсичности (Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ, 2012) мазь и гель наносили на выстриженный участок кожи размером 2 см^2 на спине белых мышей-самцов путем втирания до полного всасывания за несколько раз до дозы 4000 мг/кг. Большую дозу достичь не удалось вследствие значительного затруднения поглощения геля и возникающих при этом потерь. Оценивали выживаемость животных в течение 14 суток после нанесения.

Для расчета величины токсикологического показателя LD_{50} использовали метод Личфилда-Вилкоксона в соответствии с требованиями и инструкциями Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития [Миронов А.Н., 2012].

Подострую токсичность и местнораздрожающее действие геля и мази на основе экстракта медицинской пиявки выполняли, используя многотестовое наблюдение по С. Ирвину [Irwin S., 1964]. Исследование субхронической токсичности гелевой и мазевой лекарственных форм экстракта медицинской пиявки проводили на крысах массой 190±5,4г. В подострых опытах на крысах животным наносили препараты накожно в течение 30 дней в терапевтической, 5- и 10-кратной от терапевтической дозы для человека с учетом межвидового пересчета доз (1:7 для крыс) – 80, 400 и 800 мг геля, мази/кг. Испытанная максимальная доза в 70 раз превышают терапевтическую дозу для человека без учета межвидового пересчета доз.

Для расчета тестируемой дозы руководствовались следующим: терапевтическая доза геля и мази для крыс с учетом межвидового пересчета доз [Freireich E.J. et al., 1966] составляет (250 мг:90)*7≈ 20 мг/крысу массой 223-286 г (средний вес 250 г) или 80 мг геля/кг, где 250 мг - общая масса нанесенного геля/человека, 90 - Соотношение между площадью поверхности тела крысы и человека, 7 – межвидовой пересчет доз.

Оценивались следующие параметры:

1. Интегральные показатели: общее состояние, характер шерстного покрова, состояние слизистых оболочек (окраска, наличие и характер выделений, отечность), оформленность и цвет фекалий.

2. Изменение эмоционального состояния (вокализации, агрессия и пугливость), нарушения со стороны ЦНС (синдром Штраубера, тремор, парезы, судороги), рефлексы (слуховой, роговичный, ипсилатеральный сгибательный).

3. Двигательную, мышечную координацию и реактивность: двигательная и мышечная (удержание на проволоке, сетке) координации, поведенческая реакция (реактивность), наличие синдрома «горбатости».

4. Функциональное состояние вегетативной нервной системы: тест «открытое поле», частота дыхания, цвет кожи, ректальная температура, наличие или отсутствие экзофтальма, птоза.

Реактивность мышей оценивалась по характеру реакции на изменение окружающей обстановки в виде перемещения на открытый стол. Настороженность определяли ориентировочными рефлексами при использовании стандартного звукового раздражителя (громкий хлопок). Пугливость животных оценивалась при прикосновении корнцангом. Тремор, судороги, характер походки, изменения положения тела и конечностей оценивались при визуальном наблюдении.

До начала и после окончания введения препаратов животных взвешивали и помещали в обменные клетки на сутки при свободном доступе к воде для определения суточного диуреза и pH мочи [Шумская Н.И., Карамзина Н.Н., 1966]. Состояние сердечно-сосудистой системы оценивали с помощью электрокардиографии во втором отведении до начала эксперимента и при его завершении. Влияние на функциональное состояние нервной системы оценивали по показателям спонтанной двигательной активности [Буркацкая Е.М. и соавт., 1980]. Местно-раздражающее действие оценивали при макроскопическом и микроскопическом исследовании мест нанесения образцов, содержавших экстракт пиявки медицинской.

О действии исследуемых препаратов на состояние животных судили по изменению регистрируемых показателей по сравнению с контрольными значениями, а также проводили сравнение результатов опытных групп между собой.

Статистический анализ данных проводили с использованием программ Microsoft Excel 2016 (Microsoft corp., USA), Statistica 13.2 (Dell inc., USA), IBM SPSS Statistics v25 (IBM corp., USA). Проверку нормальности распределения количественных переменных проводили с помощью критериев Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова с поправкой Лилиефорса.

Сравнение количественных переменных в двух независимых группах проводили с помощью критерия Манна-Уитни. Для трех групп пользовались критерием Краскела-Уоллиса с апостериорными сравнениями. Параметры нормальных распределений признаков в выборках описывали в формате M±m (средние значения и среднеквадратическое отклонение).

ГЛАВА 3. Изучение специфической фармакологической активности субстанции, геля и мази гирулюкс

3.1 Оценка противовоспалительной активности экстракта, мази и геля на основе экстракта пиявки медицинской при формалиновом отеке

Результаты исследования показали, что при субплантарном введении 0,1 мл 2% раствора формалина у подопытных мышей развивается выраженный отек лапы, о чем свидетельствует достоверное увеличение ее объема. Отмечено, что через 4 часа после введения формалина объем лапы у подопытных животных контрольной группы увеличился на 65,3± 1,5%.

Анализ результатов экспериментального исследования показал, при накожном применении экстракта пиявки в различных лекарственных формах отмечается уменьшение выраженности индуцированного формалином отека лапы у мышей (табл.4). Так было выявлено, что под влиянием формалина объем лапы подопытных животных, получавших образец субстанции гирулюкс, увеличился на 45,3±0,5%, что было в 1,4 раза ($p<0,05$) меньше, чем в контроле (мыши с «формалиновым» отеком лапы, получавшие наружно изотонический раствор натрия хлорида).

Таблица 4 – Влияние экстракта пиявки медицинской, мази и геля ЭМП, гепарина и диклофенака на выраженность «формалинового» отека лапы у мышей

№ п/п	Опыт	Толщина лапки подопытных мышей, мм (M ± m)		Увеличение толщины лапки
		До введения раствора формалина	Через 4 часа после введения раствора формалина	мм (M ± m)
1	Контроль	2,15±0,06	3,70±0,06	1,55±0,03
2	Субстанция гирулюкс (экстракт пиявки	2,41±0,03	3,67±0,13	1,26±0,11

	медицинской), водный раствор			
3	Мазь «гирулюкс, мазь для наружного применения», 1%	2,26±0,05	3,36±0,04	1,10±0,05
4	Мазь гепарина (Гепариновая мазь 1000МЕ; ОАО «НИЖФАРМ», Россия)	2,32±0,07	3,78±0,04	1,45±0,07
5	Мазь диклофенака (Ортофен, мазь 2%; ЗАО «Вертекс», Россия)	2,42±0,08	3,31±0,07	0,89±0,12
6	Гель «гирулюкс, гель для наружного применения», 1%	2,39±0,08	3,77±0,08	1,39±0,11
7	Гель гепарина (Heparin-Akhrigel 1000МЕ; Акрихин ХФК ОАО, Россия)	2,39±0,08	3,96±0,10	1,47±0,10
8	Гель диклофенака (Диклофенак гель 1%; ОАО «Биохимик», Россия)	2,50±0,09	4,12±0,07	1,62±0,12

При субплантарном введении 0,1 мл 2% раствора формалина у подопытных мышей развивается выраженный отек лапы, о чем свидетельствует достоверное увеличение ее объема. Через 4 часа после введения формалина объем лапы у подопытных животных контрольной группы увеличился на 72,1±2,8%. При накожном нанесении ЭМП отмечается уменьшение выраженности индуцированного формалином отека лапы у мышей до 52,28±4,60%, что в 1,38 раза ($p<0,05$) меньше, чем в контроле. Выраженность противовоспалительного эффекта 1%, мази с ЭМП соответствовала активности водного извлечения ЭМП, тогда как гель с ЭМП действовал слабее (Диаграмма 1). Вышесказанное проявилось также в отношении активностей мази и геля диклофенака.

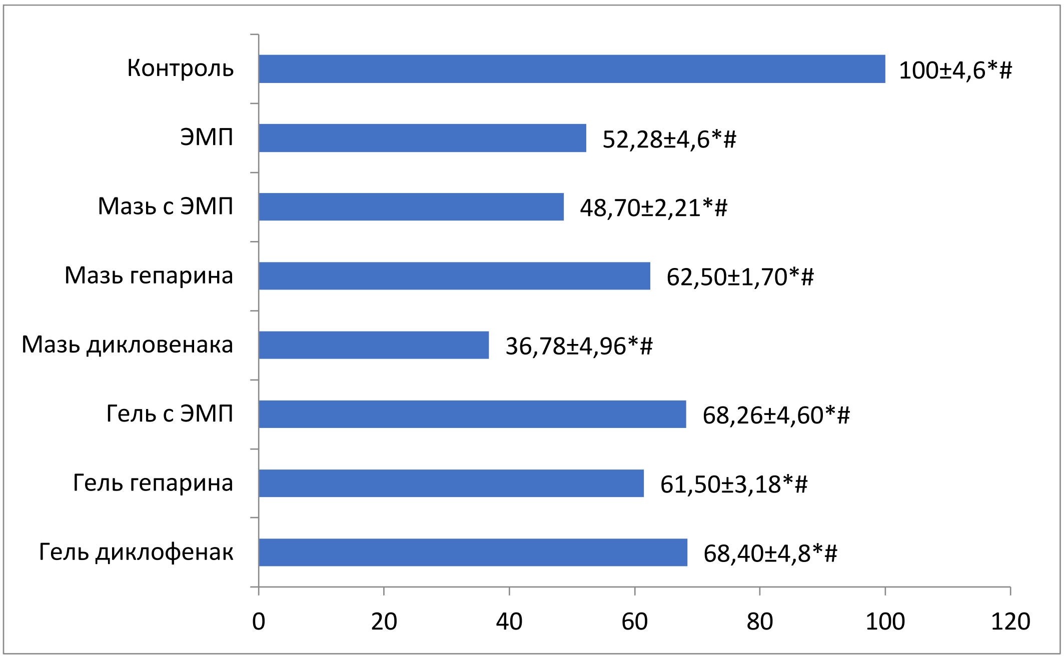

Диаграмма 1. Влияние субстанции гирулюкс, мази и геля гирулюкс, гепарина и диклофенака на выраженность «формалинового» отека лап мышей. По оси абсцисс – выраженность отека в %. * - различия с контролем достоверны при $p<0,05$, # - различия с исходным уровнем достоверны при $p<0,05$.

Так, наибольший эффект в отношении противоотечного действия проявила мазь диклофенака (63,22±4,96%), в 1,64 раза более выраженный ($p<0,05$), чем гель диклофенака (38,5± 4,8%). Также достаточно высокий достоверный эффект проявил ЭМП и мазь на основе ЭМП, составивший 47,72±4,6% и 51,3±2,2%, соответственно, в 1,6 раза более выраженный, чем гель на основе ЭМП (31,74±4,6%). Достоверный эффект выявлен для мази и геля гепарина, составивший 37,5±1,7% и 38,5,5±3,18%, соответственно.

Наличие двух лекарственных форм (гель и мазь) обеспечивает более широкий спектр применения лекарственных средств на основе экстракта пиявки медицинской. Гель, по сравнению с мазью, имеет кислотность (уровень pH), приближенную к кислотности здоровой кожи, поэтому считается более физиологичным средством. Мазь постепенно распределяется и впитывается медленнее. Гелю присущи как подсушивающие, так и насыщающие кожу жидкостью (гидрофильные) свойства; мазь отличается большей вязкостью, чем гель.

Таким образом, противовоспалительное действие ЭМП и мази на основе ЭМП лишь в 1,3 раза менее выраженное, чем мазь диклофекнака при применении в эквивалентных дозах, но 1,3 раза более выраженное, чем мазь гепарина.

3.2 Оценка противовоспалительной активности субстанции, мази и геля экстракта пиявки при «фетровой» гранулеме у крыс

Животные были разделены на группы: опытные и контрольную. Крысам первой опытной группы ежедневно на участок кожи в месте имплантации фетра с легким растиранием наносили исследуемые мазь и гель с экстрактом пиявки, и препараты сравнения; животным контрольной группы – изотонический раствор натрия хлорида.

Анализ результатов экспериментального исследования противовоспалительной активности показал, что при накожном применении экстракта пиявки отмечается уменьшение выраженности экссудативной реакции и отсутствие пролиферативной, на модели «фетровой» гранулемы у крыс (табл.5).

Таблица 5 – Влияние исследуемых препаратов на экссудативную и пролиферативную реакции при «фетровой» гранулеме у крыс

№	Исследуемые препарат	Выраженность реакции на 8-й день после имплантации фетра под кожу подопытных кры	
		Пролиферативная реакция, %, M±m	Экссудативная реакция, %, M±m
1	Субстанция гирулюкс (экстракт пиявки медицинской), водный раствор	9,6±0,5	52,5±2,0*
2	Мазь «гирулюкс, мазь для наружного применения», 1%	8,9±1,0	57,5±4,1*
3	Гель «гирулюкс, гель для наружного применения», 1%	10,6±1,5	62,5±2,3
4	Мазь гепарина (Гепариновая мазь 1000МЕ; ОАО «НИЖФАРМ», Россия)	8,6±1,4	56,6±2,7*
5	Гель гепарина (Heparin-Akhrigel 1000МЕ; Акрихин ХФК ОАО, Россия)	10,1±0,8	60,8±2,0
6	Мазь диклофенака (Ортофен, мазь 2%; ЗАО «Вертекс», Россия)	9,7±0,9	42,9±4,6*
7	Гель диклофенака (Диклофенак гель 1%; ОАО «Биохимик», Россия)	9,8±0,9	63,1±4,1
8	Контроль	9,4±0,8	66,1±3,3

Примечание:* - *различия с контролем достоверны (p<0,05)*

Таким образом, анализ результатов экспериментального исследования противовоспалительной активности показал, что при накожном нанесении ЭМП на модели «фетровой» гранулемы у крыс отмечается уменьшение выраженности экссудативной реакции без влияния на пролиферативную.

3.3 Оценка действия исследуемых препаратов при геморрагических повреждениях мягких тканей у крыс (экспериментальная подкожная гематома)

Эксперименты выполнены на 80 крысах. Подопытные животные были разделены на 8 групп (по 10 крыс в каждой группе). Крысам опытной группы ежедневно накожно с легким втиранием наносили экстракт пиявки, гель и мази с экстрактом пиявки до полного исчезновения гематом. Подопытным животным группы сравнения ежедневно накожно, непосредственнно на область геморрагического повреждения, с легким втиранием наносили гель гепарина. Животные контрольной группы получали изотонический раствор натрия хлорида.

Таблица 6 – Влияние исследуемых препаратов на течение геморрагических повреждений мягких тканей у крыс

№	Исследуемые препараты	Сроки восстановления тканей после геморрагических повреждений, дни	
		Опыт	% изменений
1	Субстанция гирулюкс (экстракт пиявки медицинской), водный раствор	3,6±0,2*	-13,6±4,5*
2	Мазь «гирулюкс, мазь для наружного применения», 1%	3,8±0,4*	-13,2±3,5*
3	Гель «гирулюкс, гель для наружного применения», 1%	3,8±0,2*	-13,6±4,5*

4	Мазь гепарина (Гепариновая мазь 1000МЕ; ОАО «НИЖФАРМ», Россия)	4,0±0,2	-12,1±5,4
5	Гель гепарина (Heparin-Akhrigel 1000МЕ; Акрихин ХФК ОАО, Россия)	3,9±0,3	-11,4±6,8
6	Мазь диклофенака (Ортофен, мазь 2%; ЗАО «Вертекс», Россия)	4,1±0,3	-12,3±4,8
7	Гель диклофенака (Диклофенак гель 1%; ОАО «Биохимик», Россия)	4,0±0,4	-12,1±4,3
8	Контроль	4,4±0,2	-0,0±4,5

Примечание:* - *различия с контролем достоверны (р<0,05)*

Результаты показали, что время рассасывания гематом после геморрагических повреждений мягких тканей при использовании экстракта пиявки достоверно уменьшалось в среднем в 1,22 раза, а геля с ЭМП – в 1,16 раза.

Представленные данные по действию ЭМП, геля с экстрактом пиявки и геля гепарина при геморрагических повреждениях мягких тканей у крыс указывают на то, что как сам экстракт, так и гель с экстрактом МП при накожном нанесении в течение 10 суток приводят в отличие от геля с гепарином к достоверному сокращению времени восстановления геморрагических повреждений мягких тканей у крыс (табл.6).

3.4 Оценка противовоспалительного действия при заживлении ран

Эксперименты выполнены на 80 крысах. Предварительно у подопытных животных удалили волосяной покров на части кожи спины площадью не менее 3х3 см^2. Послойные кожные раны наносили с помощью трафарета площадью 225 мм² с использованием местной анестезии (лидокаин) при соблюдении правил асептики и антисептики. Заживление кожных ран происходило открытым способом. На кожу подопытных животных ежедневно наносили исследованные вещества и препараты сравнения. Животным контрольной группы наносили изотонический раствор натрия хлорида.

Таблица 7 – Влияние исследуемых препаратов на скорость заживления послойных кожных ран у крыс

№	Исследуемые препараты	Сроки заживления после нанесения послойных кожных ран, дни	
		Опыт	% изменений
1	Субстанция гирулюкс (экстракт пиявки медицинской), водный раствор	8,0±0,2	4,8±2,5
2	Мазь «гирулюкс, мазь для наружного применения», 1%	8,1±0,2	3,6±2,5
3	Гель «гирулюкс, гель для наружного применения», 1%	8,0±0,2	4,6±3,4
4	Мазь гепарина (Гепариновая мазь 1000МЕ; ОАО «НИЖФАРМ», Россия)	7,9±0,3	5,9±3,8
5	Гель гепарина (Heparin-Akhrigel 1000МЕ; Акрихин ХФК ОАО, Россия)	7,7±0,4	5,4±3,2
6	Мазь диклофенака (Ортофен, мазь 2%; ЗАО «Вертекс», Россия)	7,5±0,2	5,2±4,8
7	Гель диклофенака (Диклофенак гель 1%;	7,6±0,2	5,3±4,5

	ОАО «Биохимик», Россия)		
8	Контроль	8,4±0,20	0,0±2,40

Примечание:* - *различия с контролем достоверны (p<0,05)*

Сравнительный анализ действия мази с экстрактом пиявки и мази гепарина при послойных кожных ранах у крыс показал, что достоверных различий в скорости заживления кожных ран при действии экстракта пиявки и мази с экстрактом пиявки отмечено не было, но наблюдалась тенденция к ускорению процесса заживления на 0,4 дня (4,8%) и на 0,3 дня (3,6%), соответственно (табл.7).

3.5 Оценка противовоспалительного действия при ожогах

Эксперименты выполнены на 80 крысах. Предварительно у подопытных животных удалили волосяной покров на части кожи спины площадью не менее 3х3 $см^2$. Ожоги на кожу наносили с помощью предварительно нашретой медной пластины до 200°С площадью 225 $мм^2$ с использованием местной анестезии (лидокаин) при соблюдении правил асептики и антисептики. Заживление кожных ран происходило открытым способом. На кожу подопытных животных ежедневно наносили экстракт пиявки, мазь на ее основе и мазь гепарина. Животные контрольной группы получали изотонический раствор натрия хлорида. Наблюдения проводили до полного заживления ожоговой поверхности.

Таблица 8 – Влияние исследуемых препаратов на скорость заживления ожогов кожи у крыс

№	Исследуемые препараты	Сроки заживления ожоговых ран, дни	
		Опыт	% изменений
1	Субстанция гирулюкс (экстракт пиявки медицинской), водный раствор	10,5±0,20*	5,0±1,67*
2	Мазь «гирулюкс, мазь для наружного применения», 1%	10,4±0,20*	5,8±1,67*
3	Гель «гирулюкс, гель для наружного применения», 1%	10,4±0,40*	5,3±1,68*
4	Мазь гепарина (Гепариновая мазь 1000МЕ; ОАО «НИЖФАРМ», Россия)	11,8±0,40	4,2±3,33
5	Гель гепарина (Heparin-Akhrigel 1000МЕ; Акрихин ХФК ОАО, Россия)	11,5±0,4	4,1±3,28
6	Мазь диклофенака (Ортофен, мазь 2%; ЗАО «Вертекс», Россия)	11,8±0,3	4,8±2,71
7	Гель диклофенака (Диклофенак гель 1%; ОАО «Биохимик», Россия)	11,7±0,2	4,7±2,68
8	Контроль	12,0±0,20	0,0±1,67

Примечание:* - *различия с контролем достоверны (p<0,05)*

На 2-е сутки после операции у нелеченых крыс поверхность дефектов кожи покрывалась тонким струпом, образованным раневым отделяемым. При взятии животных в руки корочка легко повреждалась, просачивался экссудат. Были ярко выражены признаки воспаления: края раны отличаются сильной отечностью, наблюдалось гнойное воспаление на границе с омертвевшей тканью, расплавление некротических масс. В леченых группах признаки воспаления были сглажены, особенно если испытуемое вещество обладает выраженным антиэкссудативным действием.

Приведенные в таблице 8 данные указывают на то, что применение субстанции ЭМП и мази с экстрактом пиявки достоверно ускоряло заживление ожогов кожи в среднем на 5 – 6 %.

3.6 Оценка влияния мази и геля с экстрактом пиявки на время свертывания крови у кроликов

Эксперименты выполнены на 40 беспородных кроликах обоего пола массой 2,5-3 кг. До начала эксперимента у подопытных животных из краевой вены уха забирали кровь для регистрации параметров тромбоэластограммы. В течение 10 дней подопытным животных наносили с легким втиранием экстракт пиявки на участок кожи с удаленным волосяным покровом площадью 2х2 см^2. Через 10 дней ежедневного накожного применения экстракта пиявки повторно регистрировали параметры тромбоэластограммы. Подопытным животным группы сравнения в течение 10 дней наносили мазь с гепарином.

Исследование влияния опытных образцов субстанции, геля и мази Гирулюкс и препаратов сравнения мази и геля гепарина на свертываемость крови проводилось на анализаторе гемокоагуляции механическом АГКМ 1-01, тромбоэластографическим способом.

Таблица 9 – Влияние исследуемых препаратов на время свертывания крови у кроликов

Препарат	Время свертывания крови, мин	
	До опыта	Через 10 дней

Субстанция гирулюкс (экстракт пиявки медицинской), водный раствор	5,9±0,1	8,2± 0,3*
Мазь «гирулюкс, мазь для наружного применения», 1%	5,9±0,1	7,4± 0,2*
Гель «гирулюкс, гель для наружного применения», 1%	5,9±0,1	7,0±0,2*
Гель гепарина (Heparin-Akhrigel 1000МЕ; Акрихин ХФК ОАО, Россия)	6,0±0,1	6,1±0,2
Мазь гепарина (Гепариновая мазь 1000МЕ; ОАО «НИЖФАРМ», Россия)	5,8±0,2	6,0±0,1
Контроль	5,9±0,1	5,9±0,1

Примечание:* - *различия с контролем достоверны (p<0,05)*

При накожном нанесении экстракта пиявки на время свертывания крови подопытных животных достоверно увеличилось в среднем на 40%, мази с ЭМП на 30%, а при использовании геля с ЭМП на 20%. В то же время препараты гепарина при такой постановке эксперимента оказались неэффективными (табл.9).

ГЛАВА 4. Изучение острой, подострой токсичности и местнораздражающего действия геля и мази на основе экстракта медицинской пиявки

Целью доклинических токсикологических исследований фармакологического вещества является установление характера и выраженности его повреждающего действия на организм экспериментальных животных и оценка его безопасности [Миронов А.Н., 2012; «Правила лабораторной практики». Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010г. №708н г. Москва. Зарегистрирован в Минюсте РФ 13 октября 2010 г. Регистрационный №18713; ГОСТ Р 53434 – 2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики»].

4.1 Изучение острой токсичности

В опытах по определению острой токсичности препараты наносили на выстриженный участок кожи размером 2 см^2 на спине белых мышей обоего пола, путем втирания до полного всасывания за несколько раз до дозы 4000 мг/кг. Большую дозу достичь не удалось вследствие значительного затруднения поглощения мази и возникающих при этом потерь. Оценивали выживаемость животных в течение 14 суток после введения.

Согласно результатам проведенного эксперимента, препараты не вызывали летальных исходов вплоть до максимально возможной вводимой дозы 4000 мг мази/кг. При этом отсутствовали признаки токсического действия препарата.

При введении исследуемого экстракта существенных изменений в поведении животных отмечено не было. В течение дальнейших двух недель проводили наблюдения за двигательной активностью, наличием судорог, координацией движений, реакцией на раздражители, тонусом скелетной мускулатуры, дыханием, состоянием кожного покрова, шерсти и окраской видимых слизистых, потреблением воды и пищи. Достоверных заметных отклонений по сравнению с контрольной группой (физиологический раствор) выявлено не было.

Таким образом, исследованный препарат по параметрам острой токсичности может быть охарактеризован в терминах LD50>4000 мг мази/кг, соответствует 4 класс токсичности, малотоксичное (ГОСТ 12.1.007-76).

4.2 Изучение субхронической токсичности

Субхроническую токсичность мази и геля Гирулюкс, 1% ЗАО «Международный Центр Медицинской ПИЯВКИ», Россия исследовали на белых крысах обоего пола весом 226-285 г (средний вес 252 г) при 30-дневном введении. В эксперименте использовали 40 лабораторных животных. Исследованные дозы составляли 80, 400 и 800 мг мази/кг и геля/кг (равную и в 5 и 10 раз превышавшие терапевтическую для человека с учетом межвидового пересчета доз) (табл.10).

Таблица 10 - Динамика массы тела крыс при субхроническом нанесении накожных аппликаций препаратов «гирулюкс, мазь для накожного применения» и «гирулюкс, гель для накожного применения» (мазь/гель)

Группа, доза мази/гель	Масса тела, г (мазь/гель)			
	Исход	Через 10 дней	Через 20 дней	Через 30 дней
гирулюкс, 80 мг/кг	249±6/ 253±5	265±6/ 267±3	276±5/ 279±3	296±9/ 289±3
гирулюкс, 400 мг/кг	244±6/ 254±6	260±3/ 262±4	274±5/ 277±4	298±6/ 288±4
гирулюкс, 800 мг/кг	246±8/ 251±5	266±7/ 266±5	277±8/ 278±5	298±7/ 287±5
Контроль	248±6/ 249±4	265±6/ 264±4	279±8/ 279±4	300±7/ 290±4

Изменение массы тела и внутренних органов животных.

Общее состояние животных, внешний вид, подвижность опытных животных не отличались от контрольной группы. Наблюдается опрятность шерсти, наличие характерного для животных группы контроля блеска. Масса тела подопытных и контрольных животных незначительно возросла за время опыта, причем для животных, получавших опытный препарат во всех испытанных дозах отсутствовали изменения скорости прироста массы тела в сравнении с группой контрольных животных. Относительная масса внутренних органов у крыс опытных групп соответствовала этому показателю у контрольных животных. Наблюдавшиеся колебания значений находились в пределах физиологической нормы (табл.11).

Суточное потребление сухого, влажного корма и воды подопытными животными при воздействии изучаемого препарата и контроля также не имели существенных различий (табл.12-13).

Таблица 11 - Относительная масса органов крыс после накожного нанесения «гирулюкс, мазь для накожного применения» и «гирулюкс, гель для накожного применения» в течение 30 суток, г/100 г массы (мазь/гель)

Группа, доза мази/гель	Печень	Сердце	Селезенка	Почки	
				левая	правая
гирулюкс, 80 мг/кг	3,69±0,15/ 4,04±0,14	0,384±0,02/ 0,340±0,01	0,339±0,02/ 0,355±0,01	0,351±0,02/ 0,341±0,01	0,353±0,02/ 0,344±0,02
гирулюкс, 400 мг/кг	4,05±0,13/ 4,06±0,14	0,374±0,02/ 0,333±0,02	0,339±0,02/ 0,345±0,02	0,353±0,01/ 0,343±0,01	0,354±0,02/ 0,347±0,02
гирулюкс, 800 мг/кг	3,99±0,10/ 4,04±0,14	0,383±0,14/ 0,336±0,02	0,340±0,01/ 0,345±0,02	0,358±0,01/ 0,343±0,01	0,361±0,01 0,347±0,02
Контроль	3,97±0,08/ 4,00±0,14	0,380±0,01/ 0,336±0,02	0,328±0,01/ 0,353±0,14	0,356±0,01/ 0,342±0,14	0,352±0,01/ 0,343±0,15

Таблица 12 - Суточное потребление сухого корма (в г) на крысу при накожном нанесении нанесения «гирулюкс, мазь для накожного применения» и «гирулюкс, гель для накожного применения» (n = 20) (мазь/гель)

Группа, доза мази/гель	Дни измерений			
	Фон	10	20	30
гирулюкс, 80 мг/кг	20,8/19,5	21,4/20,3	21,7/21,1	23,0/23,4
гирулюкс, 400 мг/кг	20,2/20,0	20,9/20,4	22,0/20,9	22,4/22,9
гирулюкс, 800 мг/кг	21,0/19,8	21,5/20,0	22,1/21,2	22,7/23,0
Контроль	20,5/20,1	21,7/20,5	22,2/21,2	22,6/22,7

Таблица 13 - Суточное потребление вареного корма (в г) на крысу при накожном нанесении нанесения «гирулюкс, мазь для накожного применения» и «гирулюкс, гель для накожного применения» (n = 20) (мазь/гель)

Группа, доза мази/гель	Дни измерений			
	Фон	10	20	30
гирулюкс, 80 мг/кг	34,2/33,4	34,0/34,5	35,3/36,1	36,2/37,0
гирулюкс, 400 мг/кг	34,1/32,2	34,2/33,9	35,6/35,5	35,7/37,5
гирулюкс, 800 мг/кг	33,7/33,2	34,0/34,5	35,1/35,9	35,4/36,9
контроль	33,9/32,8	35,1/34,3	35,8/36,0	36,5/37,1

Таблица 14 - Суточное потребление воды (в мл) на крысу при накожном нанесении нанесения препаратов «гирулюкс, мазь для накожного применения» и «гирулюкс, гель для накожного применения» (n = 20) (мазь/гель)

Группа, доза мази/гель	Дни измерений			
	Фон	10	20	30
гирулюкс, 80 мг/кг	21,4/22,0	22,1/22,5	23,5/21,9	25,5/24,8
гирулюкс, 400 мг/кг	21,1/21,9	20,5/22,8	22,9/22,0	24,6/25,0
гирулюкс, 800 мг/кг	21,0/21,6	22,2/23,1	22,8/22,5	25,0/25,7
контроль	20,4/21,8	22,2/22,9	23,7/22,4	25,4/24,9

Состояние периферической крови.

Гематологические исследования показали, что испытанная лекарственная форма «гирулюкс, мазь для наружного применения» и «гирулюкс, гель для наружного применения» при ежедневных накожных аппликациях в течение 30 дней в дозах 80, 400 и 800 мг мази/кг и геля/кг не приводит к достоверному изменению содержания форменных элементов в крови в сравнении с контрольной группой и с исходными данными.

При накожном нанесении препаратов на протяжении 30 дней показатели периферической крови крыс (гемоглобин, эритроциты, лейкоциты, цветовой показатель, тромбоциты) подопытных групп не отличались от контроля. Представленные в таблицах 15-17 данные для опытных групп сопоставимы с аналогичными данными, полученными в контрольной группе, и находятся в пределах нормальных значений для этого вида животных (Трахтенберг И.М. и др., 1978).

Таблица 15 - Состояние периферической крови крыс до курсового накожного нанесения «гирулюкс, мазь для накожного применения» и «гирулюкс, гель для накожного применения» в течение 30 суток (мазь/гель)

Группа, доза мази/гель	Эритроц., 10^{12} /л	Гемогл., г/л	Лейкоц., 10^9 /л	Тромбоц., 10^9 /л	Цвет. показ.
гирулюкс, 80 мг/кг	5,1±0,1/ 5,2±0,2	130±5/ 134±9	8,2±0,3/ 8,3±0,3	336±16/ 338±15	0,77±0,02/ 0,77±0,04
гирулюкс, 400 мг/кг	5,1±0,1/ 5,2±0,2	129±6/ 132±7	8,8±0,3/ 7,9±0,3	337±12/ 323±11	0,75±0,03/ 0,76±0,03
гирулюкс, 800 мг/кг	5,1±0,2/ 5,3±0,2	131±5/ 136±9	8,4±0,4/ 7,8±0,4	322±7/ 336±14	0,76±0,02/ 0,77±0,03
контроль	5,1±0,2/ 5,0±0,2	129±5/ 129±7	8,2±0,4/ 8,0±0,3	330±14/ 355±11	0,76±0,02/ 0,78±0,03

Таблица 16 - Состояние периферической крови крыс после курсового накожного нанесения «гирулюкс, мазь для накожного применения» и «гирулюкс, гель для накожного применения» в течение 10 суток (мазь/гель)

Группа, доза мази/гель	Эритроц., 10^{12} /л	Гемогл., г/л	Лейкоц., 10^9 /л	Тром-боц., 10^9 /л	Цвет. показ.
гирулюкс, 80 мг/кг	5,2±0,1/ 4,9±0,2	128±6/ 124±7	8,3±0,3/ 7,7±0,3	333±15/ 355±16	0,74±0,02/ 0,75±0,04
гирулюкс, 400 мг/кг	5,3±0,2/ 4,8±0,2	130±6/ 120±6	7,8±0,3/ 7,3±0,3	343±14/ 333±15	0,74±0,02/ 0,75±0,02
гирулюкс, 800 мг/кг	5,1±0,1/ 5,1±0,2	128±5/ 126±7	8,3±0,4/ 7,5±0,4	325±6/ 323±8	0,75±0,02/ 0,74±0,02
контроль	5,2±0,1/ 4,9±0,2	130±4/ 121±6	8,1±0,3/ 7,3±0,2	337±14/ 333±15	0,75±0,02/ 0,75±0,02

Таблица 17 - Состояние периферической крови крыс после 30 дней накожного нанесения «гирулюкс, мазь для накожного применения» и «гирулюкс, гель для накожного применения» (мазь/гель)

Группа, доза мази/гель	Эритроц., 10^{12} /л	Гемогл., г/л	Лейкоц., 10^9 /л	Тром-боц., 10^9 /л	Цвет. показ.
гирулюкс, 80 мг/кг	5,2±0,1/ 5,3±0,2	126±5/ 131±8	7,5±0,3/ 8,1±0,4	340±18/ 343±18	0,75±0,03/ 0,75±0,04
гирулюкс, 400 мг/кг	5,3±0,2/ 5,3±0,3	132±7/ 133±7	8,7±0,3/ 8,5±0,3	353±13/ 359±16	0,87±0,03/ 0,75±0,03
гирулюкс, 800 мг/кг	5,3±0,2/ 5,2±0,2	131±4/ 126±8	7,6±0,4/ 8,3±0,4	336±10/ 337±16	0,76±0,04/ 0,75±0,03
контроль	5,3±0,2/ 5,2±0,1	133±5/ 127±6	7,7±0,3/ 8,1±0,3	350±15/ 351±13	0,77±0,03/ 0,73±0,02

Биохимические показатели

После 30 дней накожного нанесения исследованных препаратов не наблюдали отличий в содержании глюкозы, холестерина, белков, биллирубина и креатинина, активности ферментов АлТ, АсТ в плазме крови у подопытных животных (табл. 18-21).

Таблица 18 - Влияние «гирулюкс, мазь для накожного применения» и «гирулюкс, гель для накожного применения» на содержание глюкозы (mM/л) в плазме крови крыс самцов при накожных аппликациях в течение 30 суток (мазь/гель)

Группа, доза мази/гель	Глюкоза в плазме крови, мМ/л	
	До введения	После 30 дней введения
гирулюкс, 80 мг/кг	4,76±0,09/ 4,70±0,07	4,82±0,15/ 4,70±0,10
гирулюкс, 400 мг/кг	4,77±0,13/ 4,80±0,08	4,71±0,13/ 4,70±0,08
гирулюкс, 800 мг/кг	4,69±0,09/ 4,80±0,07	4,77±0,09/ 4,70±0,07
Контроль	4,57±0,16/ 4,70±0,06	4,72±0,17/ 4,80±0,05

Таблица 19 - Влияние «гирулюкс, мазь для накожного применения» и «гирулюкс, гель для накожного применения» на содержание холестерина (mM/л) в плазме крови крыс самцов при накожных аппликациях в течение 30 суток (мазь/гель)

Группа, доза мази/гель	Холестерин в плазме крови, мМ/л	
	До введения	После 30 дней введения
гирулюкс, 80 мг/кг	2,04±0,09/ 2,02±0,10	2,01±0,11/ 1,97±0,10
гирулюкс, 400 мг/кг	2,00±0,09/ 2,10±0,11	1,97±0,06/ 2,05±0,07
гирулюкс, 800 мг/кг	1,97±0,07/ 2,05±0,07	2,01±0,08/ 2,06±0,07

контроль	1,99±0,07/ 2,02±0,07	2,04±0,09/ 1,97±0,08

Таблица 20 - Влияние «гирулюкс, мазь для накожного применения» и «гирулюкс, гель для накожного применения» на активность АсАТ, АлАТ и содержание креатинина в крови после 30-суточных аппликаций (мазь/гель)

Группа, доза мази/гель	АсАТ ЕД/л	АлАТ ЕД/л	Креатинин мкМ/л
гирулюкс, 80 мг/кг	71,4±1,6/ 73,8±1,7	31,8±0,7/ 31,3±0,5	51,5±1,1/ 54,2±1,3
гирулюкс, 400 мг/кг	72,2±3,2/ 72,5±3,5	31,7±0,7/ 31,8±0,5	48,1±3,3/ 51,2±3,6
гирулюкс, 800 мг/кг	71,1±2,6/ 74,8±3,2	31,8±1,6/ 32,9±1,7	49,6±2,4/ 53,0±3,0
контроль	70,1±1,3/ 70,1±2,7	32,9±0,9/ 32,9±1,7	50,8±0,9/ 54,5±2,1

Группа, доза мази/гель	Общий белок, г/л	Альбумин, г/л	Глобулин, г/л	Общ. билл., мкМ/л
гирулюкс, 80 мг/кг	70,4±2,2/ 71,4±2,1	27,7±1,1/ 29,4±1,3	40,7±1,5/ 41,4±1,4	8,0±0,3/ 8,2±0,3
гирулюкс, 400 мг/кг	67,7±2,7/ 69,8±2,7	28,1±1,0/ 28,9±0,9	42,1±1,0/ 39,8±0,9	8,2±0,2/ 8,1±0,2
гирулюкс, 800 мг/кг	69,3±2,0/ 71,4±1,7	29,8±1,1/ 28,8±1,0	43,1±1,1/ 41,2±1,1	8,4±0,2/ 8,3±0,2

контроль	69,9±2,5/ 70,7±2,4	28,2±1,0/ 30,0±1,0	41,4±1,2/ 41,7±1,3	7,9±0,2/ 8,3±0,2

Таблица 21 - Влияние «гирулюкс, мазь для накожного применения» и «гирулюкс, гель для накожного применения» на содержание общего белка, альбумина, глобулина и общего биллирубина в крови крыс после накожного нанесения в течение 30 суток (мазь/гель)

Поведенческие реакции.

Поведенческие реакции подопытных животных статистически достоверно не отличались от контрольных (табл.22).

Таблица 22 - Влияние «гирулюкс, мазь для накожного применения» и «гирулюкс, гель для накожного применения» на локомоторную активность животных при накожных аппликациях в течение 30 дней (мазь/гель)

Группа, доза мази/гель	Локомоции		
	До опыта	После 10 дней	После 30 дней
гирулюкс, 80 мг/кг	91±4/ 103±4	126±5/ 117±4	143±6/ 124±8
гирулюкс, 400 мг/кг	98±7/ 108±9	132±8/ 125±10	147±8/ 114±3
гирулюкс, 800 мг/кг	91±4/ 100±5	131±5/ 127±8	137±4/ 119±3
Контроль	102±6/ 99±5	131±7/ 111±4	141±8/ 127±10

Функциональное состояние печени и почек.

О функциональном состоянии печени и почек судили по биохимическим показателям крови крыс, а также суточному диурезу животных. Полученные результаты показывают, что уровни биохимических показателей в плазме крови у крыс после многократного накожного нанесения опытного препаратов в терапевтической и 5- и 10-кратной от терапевтических доз, значительно превышающих таковые для человека, не претерпевали достоверных изменений в сравнении с группой контрольных животных. Это характерно для активности аспартат-аминотрансферазы (АсАТ) и активности аланин-аминотрансферазы (АлАТ). Уровень креатинина в плазме крови также не изменился (табл. 20), как и уровень общего белка, белковых фракций и билирубина (табл.21). Содержание общего холестерина и глюкозы не отличалось от контрольной группы животных (табл.18-19).

Моча подопытных животных была желтоватого цвета с более выраженным желтоватым оттенком в сравнении с группой контрольных животных.

Суточный объем мочи в экспериментальных группах достоверно не отличался от контрольной группы (табл.23), что указывает на отсутствие влияние препарата в испытанной дозе на функциональную активность почек.

Таблица 23 - Влияние «гирулюкс, мазь для накожного применения» и «гирулюкс, гель для накожного применения» на суточный диурез крыс и pH мочи при накожных аппликациях в течение 30 суток (мазь/гель)

Группа, доза мази/гель	Диурез за 24 часа, мл			pH мочи		
	Исход	Через 10 суток	Через 30 суток	Исход	Через 10 суток	Через 30 суток
гирулюкс, 80 мг/кг	7,9±0,5/ 7,5±0,5	9,0±0,7/ 7,8±0,6	8,8±0,4/ 7,9±0,3	7,10±0,19/ 7,3±0,1	7,19±0,08/ 7,3±0,1	7,24±0,10/ 7,1±0,1
гирулюкс, 400 мг/кг	7,0±0,5/ 7,7±0,5	9,2±0,6/ 7,4±0,6	8,8±0,2/ 7,8±0,2	7,03±0,10/ 7,2±0,1	7,27±0,08/ 7,1±0,1	7,18±0,10/ 7,1±0,1
гирулюкс, 800 мг/кг	7,4±0,2/ 7,3±0,2	9,0±0,5/ 7,8±0,5	8,2±0,3/ 7,5±0,2	7,26±0,12/ 7,2±0,1	7,15±0,11/ 7,2±0,1	7,06±0,09/ 7,1±0,1
Контроль	7,1±0,09/ 7,5±0,2	8,9±0,4/ 7,3±0,4	9,0±0,8/ 7,9±0,2	7,11±0,2/ 7,1±0,1	7,20±0,08/ 7,1±0,1	7,18±0,06/ 7,2±0,2

Функциональное состояние сердечно-сосудистой системы.

По данным, отображающим влияние исследованных препаратов – мази и геля гирулюкс для накожных аппликаций на сердечно-сосудистую систему, все изученные параметры находятся в пределах физиологических границ нормы [Трахтенберг И.М., Сова Р.Е. и др., 1978].

Статистически достоверные различия по всем изученным параметрам ЭКГ опытных групп с контрольной группой отсутствовали (табл. 24-26).

Таблица 24 - Показатели ЭКГ крыс до накожного нанесения «гирулюкс, мазь для накожного применения» и «гирулюкс, гель для накожного применения» в течение 30 суток (M±m) (мазь/гель)

Группа, доза мази/гель	ЧСС уд/мин	P мв	PQ сек	QRS	QT	RR
				сек	сек	сек
гирулюкс, 80 мг/кг	526±10/ 498±8	0,129±0,01/ 0,138±0,01	0,042±0,00/ 0,046±0,00	0,018±0,00/ 0,018±0,00	0,052±0,00/ 0,051±0,00	0,114±0,00 /0,121±0,00
гирулюкс, 400 мг/кг	520±13/ 500±11	0,129±0,01/ 0,144±0,01	0,041±0,00/ 0,044±0,00	0,019±0,00/ 0,018±0,00	0,049±0,00/ 0,053±0,00	0,116±0,00/ 0,121±0,00
гирулюкс, 800 мг/кг	511±10/ 506±7	0,134±0,00/ 0,146±0,01	0,043±0,00/ 0,044±0,00	0,019±0,00/ 0,017±0,00	0,052±0,00/ 0,050±0,00	0,118±0,00/ 0,119±0,00
Контроль	514±12/ 493±8	0,129±0,01/ 0,131±0,00	0,042±0,00/ 0,046±0,00	0,018±0,00/ 0,018±0,00	0,051±0,00/ 0,051±0,00	0,117±0,00/ 0,122±0,00

Таблица 25 - Показатели ЭКГ крыс после накожного нанесения «гирулюкс, мазь для накожного применения» и «гирулюкс, гель для накожного применения» в течение 10 суток (мазь/гель)

Группа, доза мази/гель	ЧСС уд/мин	P мв	PQ сек	QRS	QT	RR
				сек	сек	сек
гирулюкс, 80 мг/кг	521±10/ 506±11	0,133±0,01/ 0,135±0,01	0,039±0,00/ 0,042±0,00	0,017±0,00/ 0,017±0,00	0,052±0,00/ 0,051±0,00	0,116±0,00/ 0,119±0,0

гирулюкс, 400 мг/кг	512±11/ 497±10	0,122±0,01/ 0,123±0,01	0,041±0,00/ 0,040±0,00	0,018±0,00/ 0,018±0,00	0,050±0,00/ 0,053±0,00	0,118±0,00/ 0,121±0,0
гирулюкс, 800 мг/кг	519±13/ 509±11	0,139±0,00/ 0,130±0,00	0,040±0,00/ 0,041±0,00	0,018±0,00/ 0,018±0,00	0,053±0,00/ 0,053±0,00	0,116±0,00/ 0,118±0,0
контроль	506±15/ 501±14	0,123±0,01/ 0,133±0,00	0,039±0,00/ 0,043±0,00	0,019±0,00/ 0,018±0,00	0,051±0,00/ 0,051±0,00	0,119±0,00/ 0,121±0,0

Таблица 26 - Показатели ЭКГ крыс после накожного нанесения «гирулюкс, мазь для накожного применения» и «гирулюкс, гель для накожного применения» в течение 30 суток (мазь/гель)

Группа, доза мази/гель	ЧСС уд/мин	P мв	PQ сек	QRS	QT	RR
				сек	сек	сек
гирулюкс, 80 мг/кг	521±10/ 504±11	0,133±0,01/ 0,131±0,01	0,039±0,00/ 0,041±0,00	0,017±0,00/ 0,018±0,00	0,052±0,00/ 0,052±0,00	0,116±0,00/ 0,120±0,0
гирулюкс, 400 мг/кг	512±11/ 497±14	0,122±0,01/ 0,125±0,01	0,041±0,00/ 0,041±0,00	0,018±0,00/ 0,017±0,00	0,050±0,00/ 0,051±0,00	0,118±0,00/ 0,122±0,0
гирулюкс, 800 мг/кг	519±13/ 503±13	0,139±0,00/ 0,134±0,00	0,040±0,00/ 0,040±0,00	0,018±0,00/ 0,017±0,00	0,053±0,00/ 0,050±0,00	0,116±0,00/ 0,120±0,0
Контроль	506±15/ 497±14	0,123±0,01/ 0,137±0,00	0,039±0,00/ 0,040±0,00	0,019±0,00/ 0,018±0,00	0,051±0,00/ 0,052±0,00	0,119±0,00/ 0,122±0,0

4.3 Патоморфологическое исследование

Для патоморфологических исследований от животных контрольной группы, а также получавших в течение 30 суток указанные выше дозы опытного препарата, были взяты следующие органы: печень, почки, надпочечники, поджелудочная железа, тимус, 12-перстная кишка, селезенка, сердце. Кусочки нефиксированных органов после глубокого замораживания (для исключения артефактов) резали в криостате. Срезы окрашивали толуидиновым синим и эозином.

Макроскопическое исследование.

У контрольных и подопытных крыс макроскопическая картина была идентичной. Шерстяной покров в опытных группах был опрятным с характерным для здоровых животных контрольной группы блеска. Кожа без изменений. При аутопсии расположение внутренних органов правильное. В брюшной и плевральной полостях не наблюдается свободная жидкость.

Макроскопическое исследование внутренних органов не выявило патологических изменений, вызванных нанесением исследованных образцов. При вскрытии трахеи и бронхов просвет свободен, легкие на разрезе характерного розового цвета. Сердце обычных размеров, на разрезе темно-красного цвета. Желудок и 12-перстный кишечник без отеков и гиперемии слизистой оболочки. Печень на разрезе без признаков некроза. Почки, селезенка нормальных размеров без признаков патологии.

Об отсутствии выраженных патологических изменений внутренних органов животных опытной и эталонной групп в сравнении с контрольной свидетельствуют также данные морфометрического анализа.

Гистологическое исследование.

Гистологическое исследование сердца, печени, почек, отделов желудочно-кишечного тракта (желудок, тонкой и толстый кишечник), почек, тимуса, селезенки, щитовидной железы, надпочечников крыс, получавших исследованные препараты «гирулюкс, мазь для наружного применения», «гирулюкс, гель для наружного применения», показало отсутствие существенных отличий строения органов в сравнении с животными контрольной группы.

Сердце. На гистологических срезах отчетливо отмечается поперечная исчерченность миофибрилл. Ядра кардиоцитов специфически окрашены толуидиновым синим. Признаков дистрофии, воспаления, некроза не отмечено.

Печень. Исследование гистологических срезов показало, что печень крыс сохраняет балочное строение, паренхиматозные клетки равномерно окрашиваются толуидиновым синим и эозином, а ядра четко выделяются на фоне паренхимы. Случаи зернистой дистрофии отдельных гепатоцитов отсутствуют.

Почки. Отмечается сохранность гистологического строения коркового и мозгового слоев. Клубочки крупные без признаков атрофии и воспаления. Эпителий извитых и прямых канальцев, а также собирательных трубочек без признаков дистрофии. Соединительнотканная строма не отечна и не имеет клеточных инфильтратов.

Селезенка. Микроскопическое изучение препаратов селезенки показало, что красная пульпа представлена в основном эритроцитами и другими клеточными элементами крови. Лимфатические фолликулы не изменены. Признаков фиброза не отмечено.

Отделы желудочно-кишечного тракта.

Желудок. Отмечается сохранность слизистой оболочки, железы с четко выраженной структурой секреторного и выводных протоков. Строма без особенностей. Покровный эпителий не нарушен. Морфология главных и обкладочных клеток свидетельствует об отсутствии дистрофических и некротических процессов.

12-ти перстная кишка. Отмечаются четко выраженные ворсинки тонкой кишки. В эпителии имеются бокаловидные клетки. Отека и резкого полнокровия не отмечается. Ворсинки без лимфогистиоцитарных инфильтратов.

Стенка тонкого и толстого кишечника без особенностей.

Поджелудочная железа. Соединительнотканные прослойки поджелудочной железы тонкие, содержат сосуды крупного калибра. Отмечено умеренное полнокровие. Форма ацинусов округлая или овальная. Строение ациноцитов – типично. Признаков деструкции эндокриноцитов островков Лангерганса у животных контрольной и опытной групп не наблюдали.

Надпочечники. Соединительнотканная капсула без признаков воспаления. Наблюдается венозное полнокровие. Клубочковая зона представлена адренокортикоцитами, образующими округлые сплетения. Пучковая зона состоит из адренокортикоцитов кубической формы, и они ориентируются вдоль эпителиального тяжа. Мозговая часть надпочечника представлена скоплением крупных округлой формы клеток, расположенных между кровеносными сосудами.

Тимус. Сохранено типичное дольчатое строение. Структура септ без изменений. В мозговом веществе сохранен нормальный сетевидный эпителий. Строение долек типичное, клетки плотно прилегают друг к другу. Многослойный эпителий и шиповатые клетки сохраняют нормальное строение. В корковом веществе отмечается инфильтрация малыми лимфоцитами. Наблюдаются единичные нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки, гемоцитобласты. Сетевидный эпителиальный слой мозгового вещества без изменений. Тельца Гассаля без изменений. Сосуды тимуса сохраняют типичное строение.

Для животных контрольной группы при гистологическом исследовании препаратов сердца, печени, селезенки, почек, желудка, 12-ти перстной кишки, поджелудочной железы, надпочечников и тимуса не было выявлено признаков нарушения гистеоархитектоники.

Таким образом:

- определение относительной массы органов подопытных животных, получавших препараты гирулюкс в дозах 80, 400 и 800 мг мази/кг и геля/кг в течение 30 дней не выявило достоверных изменений по сравнению с контролем.

- исследованные препараты при субхроническом исследовании - в течение 30 дней накожном нанесении в дозах 80, 400 и 800 мг мази/кг и геля/кг не вызывал сколько-нибудь существенных структурных изменений в органах и тканях подопытных животных.

Проведенное исследование свидетельствует об отсутствии нарушений в гистологическом строении внутренних органов: сердца, печени, почек, отделов желудочно-кишечного тракта (желудок, 12-перстная кишка, тонкий и толстый кишечник), поджелудочной железы, тимуса, селезенки и надпочечников, взятых у подопытных крыс, по сравнению с контрольными.

4.4. Местнораздражающее действие

В работе была использована общепринятая методика оценки местнораздражающего действия в месте аппликации мази и геля. При накожных аппликациях мази и геля гирулюкс в дозах 80, 400 и 800 мг мази/кг и геля/кг в течение 30 дней выраженного местно-раздражающего действия не обнаружено. При этом при макроскопическом обследовании не выявлено гиперемии участка кожи в месте нанесения для исследуемого препарата во всех испытанных дозах и для животных контрольной группы, получавших плацебо (основу мази/геля). Следует отметить незначительную гиперемию мест нанесения препарата, как и плацебо, проявлявшуюся в течение 15 – 20 мин после нанесения. Последняя обусловлена механическим раздражением участков кожи в процессе втирания мази и не имеет отношения к какому-либо побочному действию препарата. Подтверждением этому может служить то, что при гистологическом исследовании выраженных изменений кожи также не выявлено. Отмечается сохранность эпителия при отсутствии отечности и некротических процессов.

ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Одним из важных направлений современной фармакологии является создание лекарственных средств на основе объектов живой природы, как растительного, так и животного происхождения. Наглядным примером может служить пиявка медицинская (*Hirudo medicinalis*), которая более 30 веков успешно используется в классической и современной медицине [Никонов Г.И. и соавт., 1995; Петров И.Р. и соавт., 1936; Рассадина Е.В., 2006; Linnaeus C., 1758]. Более чем полуторавековая история интенсивного изучения механизмов действия биологически активных соединений, продуцируемых медицинскими пиявками, создает предпосылки для расширения области применения гирудотерапии и создания ряда лекарственных препаратов на основе секрета слюнных желез пиявки [Лебедева А.О. и соавт., 2015; Никонов Г.И. и соавт., 1998; Baskova I.P. et al., 2008; Elliott, J.M., 2011]. Слюна пиявок является источником уникальных компонентов, действие которых направлено на профилактику и лечение тромбозов, атеросклероза, гипертензии, воспалительных процессов, сердечно-сосудистых и кожных заболеваний и т.д. [Darestani K.D. et al., 2014; Kim K.S. et al., 2017; Arami A. Et al., 2018; Lee Z.H. et al., 2019].

Разработанные и внедренные в практику лекарственные формы: гирулюкс и пиявит (желатиновые капсулы для перорального применения), а также целая серия лечебно-косметических кремов, являются препаратами "первого поколения", поскольку входящий в их состав полный набор биологически активных веществ, продуцируемых медицинскими пиявками, определяет комплексное действие на организм в целом: профилактика и лечение тромбозов, атеросклероза, гипертензии, воспалительных процессов, сердечно-сосудистых и кожных заболеваний и т.д. В тоже время, при ряде патологий, связанных с нарушениями в системе свертывания крови, а также для профилактики послеоперационных тромбозов возникает необходимость направленного антикоагулянтного действия, без воздействия на системы фибринолиза, комплемента и внешний механизм свертывания крови. В исследовании B. Risberg, H.I. Peterson (1976), изучали влияние «гирудоид» крема на процесс фибринолиза, на моделях кожи крыс и человека, подтверждая положительное влияние крема в лечении тромбофлебита. В связи с этим предпринята попытка создания препарата, направленного антипрокоагулянтного действия [Никонов Г.И. и соавт., 2001; Баскова И.П., Исаханян Г. С., 2004; Лебедева А.О. и соавт., 2014].

В настоящее время при лечении и профилактике тромбофлебита и флебита поверхностных вен, травматических гематом и отеков (в т.ч. после инъекций), варикозного расширения вен нижних конечностей (в т.ч. осложненного флебитом и трофическими язвами), комплексном лечении диабетических микро- и макроангиопатий, для терапии воспалительных процессов различной этиологии используются различные лекарственные средства, способствующие усилению местного кровообращения, расширению сосудов, препятствующие тромбообразованию, усиливающие тромболизис и т.д. [Alex R. Et al., 2015; Лебедева А.О. и соавт., 2014; Никонов Г.И. и соавт., 2015]. Одним из таких препаратов может служить экстракт из медицинской пиявки, в частности, пиявит, представляющий собой капсульную лекарственную форму порошка пиявок для приема внутрь [Кудрина Г.П., Гневковская Т.В., 1992; Прагина Л.Л., Тушмалова Н.А. и соавт., 1999; Трубин В.А., Никонов Г.И., Баскова И.П., Кошелев В.Б., 1992].

Предметом настоящего исследования явилось изучение фармакологических свойств и общетоксического действия субстанции, гелевой лекарственной формы экстракта медицинской пиявки «гирулюкс, гель для наружного применения» и мазевой лекарственной формы «гирулюкс, мазь для наружного применения» производства ЗАО «Международный Центр Медицинской ПИЯВКИ».

Исследование фармакологических свойств препаратов «гирулюкс 1% гель для наружного применения» и «гирулюкс 1% мазь для наружного применения», содержащих экстракт пиявки медицинской, проведено с использованием животных различных видов (мышей, крыс и кроликов) в терапевтических для человека дозах. При планировании экспериментальных исследований препаратов накожного применения лекарственную субстанцию гирулюкс стандартизировали по антитромбиновой и антикоагулянтной активности [Никонов Г.И. и соавт., 2014]. Согласно данным литературы в медицинской пиявке и секрете ее желез содержится большое количество БАВ, способных оказывать при надлежащем применении выраженный терапевтический эффект при целом ряде заболеваний, в частности:

Противотромботическое действие. Блокируют тромбоцитарно-сосудистое и плазменное звенья внутреннего механизма свертывания крови, а также плазменное звено гемостатического процесса на более поздних стадиях его развития и таким образом препятствуют тромбообразованию;

Восстановление лимфооттока, дренирующего очаг заболевания, полностью зависит от гиалуронидазной активности. Система гиалуроновая кислота - гиалуронидаза занимает ключевые позиции в процессах транспорта жидкости и форменных элементов из сосудистого русла в ткани и обратно. Фермент деполимеризует молекулы гиалуроновой кислоты в межклеточном веществе, что облегчает движение воды по осмотическому градиенту [Баскова И. П., Исаханян Г. С., 2004].

Можно предположить, что существует уникальная способность компонентов ЭМП переносить БАВ через роговой слой кожи в ее глубокие слои, которая обеспечивает терапевтическую эффективность препаратов на его основе.

Механизм проникновения БАВ экстракта пиявки *Hirudo medicinalis*, как нам представляется, осуществляется активным и пассивным транспортом и может быть представлен схемой, отображенной на рис.8.

Рисунок 8. Гипотетические механизмы чрезкожной проницаемости БАВ экстракта пиявки медицинской в глубокие слои кожи и сосудистое русло, обеспечивающие местные и системные терапевтические эффекты.

Пассивный транспорт обеспечивается гиалуронидазой - ферментом, катализирующим реакции гидролитического расщепления и деполимеризации гиалуроновой кислоты - компонента основного вещества соединительной ткани, который скрепляет отдельные тканевые элементы и клетки. Она облегчает проникновение в организм различных веществ, увеличивая проницаемость тканей, стенок капилляров.

Трансмембранный перенос осуществляется структурно организованной липосомой, которая обеспечивает чрезкожную проницаемость активных компонентов экстракта медицинской пиявки путем активного переноса через мембраны клеток.

Таким образом, биологически активные вещества свободно проникают в глубокие слои кожи благодаря: гиалуронидазе (по межклеточным контактам) и природной липосоме (трансмембранный перенос).

Анализ результатов экспериментальных исследований показал, что при наружном применении мазь и гель, содержащие экстракт пиявки медицинской, уменьшали выраженность «формалинового» отека лапы у мышей и экссудативную реакцию при «фетровой» гранулеме у крыс. Кроме того, мазь с экстрактом пиявки при наружном применении в среднем на 0,7 дней ускоряла заживление ожогов кожи у подопытных крыс. В экспериментах на кроликах показана способность мази и геля экстракта пиявки увеличивать время свертывания крови соответственно в 1,3 раза и 1,2 раза. Следует отметить, что по выраженности противовоспалительного эффекта препараты пиявки медицинской уступали только мази с диклофенаком в 1,5 раза ($p<0,05$), но действовали в 1,4 раза ($p<0,05$) активнее, чем мазь с гепарином.

Проведенные экспериментальные исследования на мышах, крысах и кроликах показали, что это потенциальное лекарственное средство при накожных курсовых аппликациях оказывает противовоспалительное действия, замедляет скорость свертывания крови.

В соответствии с действующими в настоящее время методическими рекомендациями в данном исследовании также проведено доклиническое изучение острой, субхронической токсичности и местнораздражающего действия представленных для исследования образцов геля «гирулюкс, гель для наружного применения» и мази «гирулюкс, мазь для наружного применения».

Субхроническая в течение 30 дней накожная аппликация крысам-самцам исходным весом 226-285 г (средняя масса 252 г) препаратами «гирулюкс, гель для наружного применения» и «гирулюкс, мазь для наружного применения» вплоть до максимально возможной дозы, как минимум 10-кратно превышающей ориентировочную терапевтическую с учетом межвидового пересчета или в 70 раз превышающей дозу в пересчете на килограмм веса для человека (80, 400 и 800 мг геля/кг), не вызывала летальных исходов, общее состояние шерсти и кожи не отличалось от контроля, аппетит был сохранен, явлений общей интоксикации не наблюдалось. Не обнаружено влияние на динамику массы, морфологический и биохимический состав крови, общее состояние, функциональную активность печени и почек, поведение животных. Исследованные мягкие лекарственные формы экстракта медицинской пиявки не вызывали отклонений гематологических и биохимических показателей крови. Патоморфологическое и микроскопическое обследование внутренних органов свидетельствуют об отсутствии признаков токсического действия препарата на внутренние органы.

Местно-раздражающее действие при макроскопическом и микроскопическом исследовании участков контакта с испытанными образцами не выявлено.

Таким образом, исследованные мазь и гель, содержащие экстракт пиявки, при накожном применении проявляют противовоспалительное и противосвертывающее свойства. В результате проведенных исследований установлено, что экстракт пиявки *Hirudo medicinalis*, является перспективным малотоксическим средством для получения на его основе различных лекарственных форм для наружного применения.

Перспективы дальнейшей разработки темы. На основании полученных результатов изучения новых лекарственных форм на основе экстракта пиявки медицинской оценивается их эффективность в качестве противовоспалительного и действия ускоряющего рассасывание гемморагических повреждений, что обеспечивает возможность их использования в различных областях медицины в качестве основного или дополнительного средства лечения. Доказанная эффективность ЭМП может являться основным действующим компонентом в создании новых лекарственных форм, таких как ректальные суппозитории, пероральные капсулы, крема.

ВЫВОДЫ

1. Экстракт пиявки медицинской, мазь 1% и гель 1% при накожном нанесении мышам в дозе 0,2 АТЕ/кг, достоверно угнетает отек лап при формалиновом отеке на 47,7, 51,3 и 31,7%, соответственно. По выраженности угнетения воспаления на модели формалинового отека изученные потенциальные лекарственные средства и препараты сравнения могут быть расположены в ряд по угнетению отека: мазь диклофенака> мазь на основе ЭМП> ЭМП> гель гепарина≥ мазь гепарина> гель на основе ЭМП> гель диклофенака. При моделировании фетровой гранулемы у крыс субстанция экстракта медицинской пиявки достоверно уменьшает экссудативную реакцию отека на 21%, мазь с экстрактом пиявки на 13%, мазь с гепарином на 14%, а мазь диклофенака на 35%. Пролиферативную реакцию отека достоверно не изменяет ни одно из изученных веществ.

2. Экстракт пиявки медицинской и гель с экстрактом, в отличие от геля гепарина, в дозе 0,09 г (0,018 АТЕ) достоверно уменьшают время восстановления тканей при геморрагических повреждениях у крыс в 1,22 и 1,16 раза, соответственно.

3. Экстракт пиявки медицинской и мазь на основе экстракта, при накожном ежедневном нанесении в течение 12 дней при ожоговых повреждениях достоверно ускоряют заживление ожоговых ран в отличие от действия мази гепарина.

4. Ежедневное в течение 10 дней курсовое накожное нанесение кроликам мази с экстрактом пиявки в дозе 0,03 АТЕ/кг приводит к увеличению времени свертывания крови подопытных животных в среднем в 1,3 раза ($p<0,05$), а при использовании геля с экстрактом пиявки в 1,2 раза ($p<0,05$).

5. Острая токсичность мази и геля с экстрактом медицинской пиявки у мышей, при накожном применении, соответствует $LD_{50}>4000$ мг/кг. В субхронических экспериментах на крысах при ежедневном (в течение 30 дней) накожном нанесении мази и геля, содержащих экстракт пиявки медицинской, не оказывает местнораздражающего действия, общетоксических эффектов при регистрации гематологических, биохимических, интегральных показателей,

функционального состояния систем и органов, состояния центральной нервной системы, сердечно-сосудистой системы и морфологической структуры внутренних органов экспериментальных животных в дозах, многократно превышающих терапевтические для человека.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

С учетом того, что в представленной работе показано, что экстракт пиявки медицинской лиофилизированный является перспективным средством для получения на его основе лекарственных форм для наружного применения, целесообразным представляется дальнейшее исследование их тормболитической и профилактической активности, а также для регистрации в качестве лекарственных средств.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфат

АлТ – аланинаминотрансфераза

АОК – антителообразующие клетки

АсТ - аспартатаминотрансфераза

БАВ – биологически активное вещество

ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа

ГТ – гирудотерапия

ИМ – инфаркт миокарда

МКПК – мононуклеарные клетки периферической крови

МП – медицинская пиявка

НПВП – нестероидный противовоспалительный препарат

НТД – нормативно-техническая документация

РОК – разеткообразующие клетки

РПГА – реакция прямой гемагглютинации

ССЖ – секрет слюных желез

ТЭГ – тромбоэластограмма

ФГА – фитогемоагглютинин

ХВН – хроническая венозная недостаточность

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

ЭкоКГ – электрокоагулограмма

ЭМП – экстракт медицинской пиявки

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдыкадырова, Н. А. Поведение медицинской пиявки (*hirudo medicinalis*) при разных режимах содержания / Н. А. Абдыкадырова, И. С. Буданов, А. А. Никишов // Инновационные процессы в АПК : сб. ст. V Междунар. науч.-практ. конф. преподавателей, молодых ученых, аспирантов и студентов. – Москва, 2013. – С. 110–112.

2. Баскова, И. П. Биологически активные вещества, продуцируемые медицинской пиявкой, и механизмы их действия : автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Баскова И. П. – Москва, 1986. – С. 17–18.

3. Баскова, И. П. Гирудотерапия / И. П. Баскова, В. Г. Бородин, К. Г. Селезнев // Методические рекомендации для практикующих врачей. – Млосква, 1990. – 23 с.

4. Баскова, И. П. Гирудотерапия. Наука и практика / И. П. Баскова, Г. С. Исаханян. – Москва : Монолит, 2004. – 507 с. : ил., табл.

5. Батоев, Д. Б. Гирудотерапия при гнойно-септических осложнениях в послеродовом периоде / Д. Б. Батоев // Клиническая и экспериментальная гирудология на пороге нового тысячелетия: материалы 6-й науч.-практ. конф. Ассоц. гирудологов России и стран СНГ / под ред.: И. П. Басковой, А. Н. Куланина. – Пятигорск, 1999. – С. 57–58.

6. Ванюшин, Б. Ф. Метилирование ДНК мозга как показатель участия генома в механизмах индивидуально приобретенной памяти / Б. Ф. Ванюшин, Н. А. Тушмалова, Л. В. Гуськова // Доклады Академии наук СССР. – 1974. – Т. 219. – С. 742–744.

7. Веденеева, Л. Ф. Применение гирудотерапии при подостром тиреоидите / Л. Ф. Веденеева, Е. П. Медведева // Материалы VI научно-практической конференции по гирудотерапии / под ред. О. Ю. Каменева. – Санкт-Петербург, 2000. – С. 32–33.

8. Винокурова, В. Д. Гирудотерапия в лечении стоматоневрологических больных / В. Д. Винокурова // Лечение медицинскими пиявками и препаратами из них : сб. ст. по материалам науч. конф. Ассоц. гирудологов 1992-1997 гг. / под ред. И. П. Басковой. – Москва, 1998. – Кн. I. – С. 41.

9. Вихерт, А. М. Морфогенез ранних долипидных стадий атерогенеза / А. М. Вихерт, В. Н. Родионова // Архив патологии. – 1983. – № 43. – С. 3–13.
10. Влияние гирудотерапии на некоторые показатели гомеостаза и липидного обмена / Б. С. Коваленко [и др.] // Лечение медицинскими пиявками и препаратами из них : сб. ст. по материалам науч. конф. Ассоц. гирудологов 1992-1997 гг. / под ред. И. П. Басковой. – Москва, 1998. – Кн. I. – С. 19.
11. Влияние препаратов из медицинских пиявок Hirudo medicinalis на метилирование ДНК печени крыс / Г. И. Никонов [и др.] // Биологические науки. – 1990. – Т. 316, № 4. – С. 21–25.
12. Волошина, Л. В. Гирудотерапия в психиатрической практике / Л. В. Волошина, О. А. Бухановская // Практическая и экспериментальная гирудология: итоги за десятилетие (1991-2001 г.г.) : материалы 7-й науч.-практ. конф. Ассоц. гирудологов России и стран СНГ / под ред. И. П. Басковой. – Люберцы, 2001. – С. 19–20.
13. Газазян, М. Г. Гирудотерапия как метод профилактики осложнений после операции кесарева сечения / М. Г. Газазян, А. В. Хардиков // Гирудо-2003 : материалы VIII конф. Ассоц. гирудологов России и стран СНГ / под ред. И. П. Басковой. – Москва, 2003. – С. 23–25.
14. Гальченко, В. К. Изменение параметров тромбоэластограммы при гирудотерапии хронических аднекситов / В. К. Гальченко, В. К. Школьный // Актуальные вопросы акушерства и гинекологии. – Львов, 1969. – С. 350–353.
15. Гантимурова, О. Г. Гирудотерапия в лечении и реабилитации больных с артериальной гипертонией / О. Г. Гантимурова, Е. А. Иванилов, Н. П. Карева // Практическая и экспериментальная гирудология: итоги за десятилетие (1991-2001 г.г.) : материалы 7-й науч.-практ. конф. Ассоц. гирудологов России и стран СНГ / под ред. И. П. Басковой. – Люберцы, 2001. – С. 8–10.
16. Гельман, Я. М. Применение пиявок при лечении воспалительных процессов женских половых органов / Я. М. Гельман // Акушерство и гинекология. – 1962. – № 4. – С. 83–84.

17. Геращенко, Л. Вам поможет медицинская пиявка : энциклопедия гирудотерапии: лечение без лекарств / Л. Геращенко, Г. Никонов. – Москва : АСТ : Астрель, 2008. – 334, [2] с.
18. Геращенко, Л. Все о пиявке Гирудотерапия для разных типов людей / Л. Геращенко. – Санкт-Петербург : Питер, 2007. – 256 с.
19. Геращенко, Л. Пиявка – ваш домашний доктор. Гирудотерапия для разных типов людей / Л. Геращенко. – Москва : Центрполиграф, 2010. – 288 с.
20. Гилева, О. С. Влияние гирудотерапии на вкусоощущения у больных глоссалгией в динамике лечения / О. С. Гилева, Т. Н. Кардынова // Гирудология-97 : материалы 5-й науч.-практ. конф. Ассоц. гирудологов России / под ред.: И. П. Басковой, А. И. Крашенюка. – Санкт-Петербург ; Зеленогорск, 1997. – С. 44–46.
21. Гирудорефлексотерапия в комплексном лечении заболеваний щитовидной железы / Н. Ф. Константинова [и др.] // Гирудология-97 : материалы 5-й науч.-практ. конф. Ассоц. гирудологов России / под ред.: И. П. Басковой, А. И. Крашенюка. – Санкт-Петербург ; Зеленогорск, 1997. – С. 31–33.
22. Гирудотерапия в комплексном лечении больных инфарктом миокарда на санаторном этапе восстановительного лечения / А. И. Дерябин [и др.] // Клиническая и экспериментальная гирудотерапия на пороге нового тысячелетия : материалы 6-й науч.-практ. конф. Ассоц. гирудологов России и стран СНГ / под. ред.: И. П. Басковой, А. Р. Куланина. – Пятигорск, 1999. – С. 8–10.
23. Гирудотерапия в комплексном лечении офтальмологических заболеваний. Практическая и экспериментальная гирудология: итоги за десятилетие (1991-2001 гг.) / Т. А. Бакалова [и др.] // Материалы 7-й научно-практической конференции Ассоциации гирудологов России и стран СНГ (30 октября – 2 ноября 2001 г.). – Люберцы, 2001. – С. 22–23.
24. Гирудотерапия в лечении вазомоторного ринита / И. В. Крымская [и др.] // Гирудо – 2003 : материалы VIII конф. Ассоц. гирудологов России и стран СНГ / под ред. И. П. Басковой. – Москва, 2003. – С. 44–46.

25. Гирудотерапия вертеброгенных радикулопатий на амбулаторном этапе / А. Т. Арутюнов [и др.] // Проблемы биотерапии : сборник : (тезисы и статьи) / под ред. И. П. Басковой. – Москва, 1998. – С. 63–67.
26. Гирудотерапия и гирудофармакология / под ред. Г. И. Никонова. – Москва : Воениздат, 2001. – Т. 3. – С. 114–123.
27. Гирудотерапия лицевых прозопалгий миогенного происхождения / Е. В. Гресько [и др.] // Практическая и экспериментальная гирудология: итоги за десятилетие (1991-2001 гг.) : материалы 7-й науч.-практ. конф. Ассоц. гирудологов России и стран СНГ / под ред. И. П. Басковой. – Люберцы, 2001. – С. 17–18.
28. Гирудотерапия у больных, перенесших расширенную струмэктомию и лучевую терапию / Р. П. Крымская [и др.] // Практическая и экспериментальная гирудология: итоги за десятилетие (1991-2001 гг.) : материалы 7-й науч.-практ. конф. Ассоц. гирудологов России и стран СНГ / под ред. И. П. Басковой. – Люберцы, 2001. – С. 24–25.
29. Голенева, О. М. Применение медицинских пиявок на здоровых животных / О. М. Голенева, Е. М. Романова, Л. А. Шадыева // Труды Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной энтомологии и арахнологии. – 2013. – Т. 52. – С. 51–54.
30. Громова, Н. Н. Применение гирудотерапии при лечении острого и хронического сальпингоофоритов и бесплодия / Н. Н. Громова // Материалы VI научно-практической конференции по гирудотерапии / под ред. О. Ю. Каменева. – Санкт-Петербург, 2000. – С. 24–27.
31. Губин, В. Н. Клиническая эффективность рефлексогирудотерапии у больных ишемической болезнью сердца / В. Н. Губин, Н. А. Губина // Практическая и экспериментальная гирудология: итоги за десятилетие (1991-2001 гг.) : материалы 7-й науч.-практ. конф. Ассоц. гирудологов России и стран СНГ / под ред. И. П. Басковой. – Люберцы, 2001. – С. 6–7.
32. Дифференцированное лечение с применением гирудотерапии отдельных форм дисциркуляторной энцефалопатии в городе-курорте Ессентуки / А. В. Попроцкий [и др.] // Практическая и экспериментальная гирудология: итоги за десятилетие

(1991-2001 гг.) : материалы 7-й науч.-практ. конф. Ассоц. гирудологов России и стран СНГ / под ред. И. П. Басковой. – Люберцы, 2001. – С. 30–32.
33. Жаров, Д. Г. Секреты гирудотерапии, или как лечиться пиявками / Д. Г. Жаров. – Ростов-на-Дону : Феникс, 2003. – 320 с.
34. Жернов, В. А. Восстановительная медицина. Гирудотерапия : учеб.-метод. пособие / В. А. Жернов, М. М. Зубаркина. – Москва : РУДН, 2004. – 53 с.
35. Жернов, В. А. Гирудотерапия как корригирующая технология восстановительной медицины : учеб.-метод. пособие / В. А. Жернов, М. М. Зубаркина. – Москва : Изд-во РУДН, 2006. – 50 с.
36. Жернов, В. А. Использование метода гирудотерапии в практическом здравоохранении : метод. рек. № 2002/78 / В. А. Жернов [и др.]. – Москва : Федеральный научный клинико-экспериментальный центр традиционных методов диагностики и лечения Минздрава России, 2002. – 22 с.
37. Завалова, Л. Л. Дестабилаза – фермент, продуцируемый медицинской пиявкой. Специфичность действия / Л. Л. Завалова, Е. В. Кузина, И. П. Баскова // Гирудотерапия и гирудофармакология : материалы второй конф. федерации гирудологов. – Москва, 1992. – С. 140–144.
38. Завалова, Л. Л. Появление протеолитической активности у дестабилазы – изопептидазы в результате денатурации додецилсульфатом натрия / Л. Л. Завалова, И. П. Баскова, Е. В. Кузина // Успехи гирудологии : материалы третьей конф. Ассоциации гирудологов. – Москва, 1993. – С. 51–52.
39. Иванов, В. С. Заболевания парадонта / В. С. Иванов. – 3-е изд., перераб. и доп. – Москва : Медиц. инф. агентство, 1998. – 294 с. : ил.
40. Изучение влияния низкомолекулярной фракции секрета пиявки на транспорт катионов и кальция в тромбоцитах и эритроцитах человека / Г. В. Афанасьева [и др.] // Клиническая и экспериментальная гирудология на пороге нового тысячелетия : материалы. 6-й науч.-практ. конф. Ассоц. гирудологов России и стран СНГ / под ред.: И. П. Басковой, А. Н. Куланина. – Пятигорск, 1999. – С. 110–111.

41. Исаханян, Г. С. Пути реализации лечебного эффекта гирудотерапии / Г. С. Исаханян // Гирудо-2003 : материалы VIII конф. Ассоц. гирудологов России и стран СНГ / под. ред. И. П. Басковой – Москва, 2003. – С. 10–11.
42. Казеев, Г. В. Ветеринарная акупунктура : (науч.-практ. руководство) / Г. В. Казеев. – Москва : РИО РГАЗУ, 2000. – 398 с.
43. Каменев, В. Г. Лечение язвенной болезни комбинированными методами гирудотерапии в научно-исследовательском центре «Биотерапия» / В. Г. Каменев // Клиническая и экспериментальная гирудология на пороге нового тысячелетия : материалы 6-й науч.-практ. конф. Ассоц. гирудологов России и стран СНГ / под ред.: И. П. Басковой, А. Р. Куланина. – Пятигорск. 1999. – С. 50–51.
44. Каменев, О. Ю. Влияние токсичных веществ на выживание новорожденной и половозрелой медицинской пиявки / О. Ю. Каменев// Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2008. – № 1 (10). – С. 134–137.
45. Каменев, О. Ю. Ресурсы медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis L.*) в акваториях Западного Предкавказья и их рациональное использование : автореф. дис. … канд. биол. услуг / Каменев О. Ю. – Краснодар, 2007. – 24 с.
46. Каменев, Ю. Я. Вам поможет медицинская пиявка / Ю. Я. Каменев, О. Ю. Каменев. – Санкт-Петербург : ИГ «Весь», 2009. – 192 с.
47. Каменев, Ю. Я. Вам поможет пиявка : практ. руководство по гирудотерапии / Ю. Я. Каменев, О. Ю. Каменев. – Санкт-Петербург, 2003. – 48 с.
48. Капусткина, Н. И. *Aeromonas hydrophila* как бактерия-симбионт пиявок *Hirudo medicinalis*. Микробиологические особенности «дикой» и выращенной в искусственно созданных условиях пиявок: Молекулярно-клеточные механизмы патогенного и иммуногенного действия *Aeromonas spp*. / Н. И. Капусткина, Е. А. Титова, Г. И. Никонов // Сборник научных трудов Российско-китайского семинара. – Москва, 2007. – С. 45–51.
49. Карташева, Е. А. Влияние лечения пиявками на появление гифем у больных, оперированных по поводу острого приступа глаукомы / Е. А. Карташева // Труды Московского областного научно-исследовательского института. – Москва, 1979. – Т. 25. – С. 106–107.

50. Касимов, С. Ш. Клиническая и экспериментальная гирудотерапия при лечении неврита и невралгии седалищного нерва / С. Ш. Касимов // Известия АН АзССР. Сер. биол. и мед. наук. – 1961. – № 4. – С. 91–95.
51. Качан, А. Т. Анатомо-топографическое расположение корпоральных точек акупунктуры и показания к их применению / А. Т. Качан, Н. Н. Богданов, П. Х. Варнаков. – Воронеж : Изд-во Воронеж. ун-та, 1986. – 142 с. : ил.
52. Клебановас, Ю. Влияние препарата рекомбинантного гормона роста человека биосомы на процесс заживления глубокого ожога кожи крыс / Ю. Клебановас, Л. Лашас, Д. Лашенеи др. // Проблемы эндокринологии. — 2005. — Т. 51, No1. — С. 42–46.

53. Кнорре, А. Г. Развитие вегетативной нервной системы в эмбриогенезе позвоночных и человека / А. Г. Кнорре, Л. В. Суворова. – Москва : Медицина, 1984. – 272 с. : ил.
54. Кобахидзе, Д. Н. К изучению гидростойкости медицинской пиявки / Д. Н. Кобахидзе // Сообщение АН Грузинской ССР. Зоология. – Тбилиси, 1944. – Т. 5, вып. 4. – С. 423–429.
55. Константинова, Н. Ф. Нетрадиционные методы в комплексном лечении больных сахарным диабетом II типа и ожирением / Н. Ф. Константинова, С. Б. Стальмаков // Клиническая и экспериментальная гирудология на пороге нового тысячелетия : материалы 6-й науч.-практ. конф. гирудологов России и стран СНГ / под ред.: И. П. Басковой, А. Н. Куланина. – Пятигорск, 1999. – С. 45–46.
56. Коныртаева, Н. Н. Гирудотерапия в лечении вертеброгенной патологии / Н. Н. Коныртаева, А. М. Тулесаринов // Клиническая и экспериментальная гирудология на пороге нового тысячелетия : материалы 6-й науч.-практ. конф. гирудологов России и стран СНГ / под ред.: И. П. Басковой, А. Н. Куланина. – Пятигорск, 1999. – С. 21–22.
57. Коротков, К. Г. Метод газоразрядной визуализации – новый научный инструмент в гирудотерапии / К. Г. Коротков, А. И. Крашенюк // Гирудология-97 : материалы 5-й науч.-практ. конф. Ассоц. гирудологов России / под ред.: И. П. Басковой, А. И. Крашенюка. – Санкт-Петербург ; Зеленогорск, 1997. – С. 77–82.

58. Коротков, К. Г. Разработка научных основ и практическая реализация биотехнических измерительно-вычислительных систем анализа газоразрядного свечения, индуцированного объектами биологической природы : автореф. дис. … доктора техн. наук / Коротков К. Г. – Санкт-Петербург, 1999. – 32 с.
59. Кошелев, В. Б. Этиология и патогенез артериальной гипертензии // Элементы патологической физиологии и биохимии / ред. И. П. Ашмарин ; МГУ. – Москва, 1997. – С. 93–108.
60. Крашенюк, А. И. Волновые эффекты гирудотерапии / А. И. Крашенюк // Практическая и экспериментальная гирудология: итоги за десятилетие (1991-2001 гг.) : материалы 7-й науч.-практ. конф. Ассоц. гирудологов России и стран СНГ / под ред. И. П. Басковой. – Люберцы, 2001. – С. 41–44.
61. Крашенюк, А. И. К вопросу о существовании энергоинформационных болезней человека / А. И. Крашенюк, К. Г. Коротков // Клиническая и экспериментальная гирудология на пороге нового тысячелетия : материалы 6-й науч.-практ. конф. Ассоц. гирудологов России и стран СНГ / под ред.: И. П. Басковой, А. Н. Куланина. – Пятигорск, 1999. – С. 91–93.
62. Крашенюк, А. И. Нейротрофический фактор пиявки медицинской / А. И. Крашенюк, С. В. Крашенюк, Н. И. Чалисова // Гирудология-97 : материалы 5-й науч.-практ. конф. Ассоц. гирудологов России / под ред.: И. П. Басковой, А. И. Крашенюка. – Санкт-Петербург ; Зеленогорск, 1997. – С. 90–94.
63. Крашенюк, А. И. Новые возможности гирудотерапии - волновые эффекты медицинских пиявок / А. И. Крашенюк, С. В. Крашенюк, К. Г. Коротков // Жизнь и безопасность. – 2003. – № 1/2. – С. 152–157.
64. Крячко, О. В. Влияние гирудотерапии на биохимические показатели крови при интоксикационном синдроме у собак / О. В. Крячко, Л. А. Лукьянова // Практик. – 2008. – № 1. – С. 92–95.
65. Кузнецов, Н. О влиянии секрета медицинской пиявки на свертываемость крови / Н. Кузнецов // Журнал Русского общества охранения народного здравия. – 1895. – № 11. – С. 861.

66. Кунаева, Е. К. Возможности применения медицинских пиявок в ветеринарной практике / Е. К. Кунаева, И. С. Буданов // Инновационные процессы в АПК : сб. ст. III Междунар. науч.-практ. конф. преподавателей, молодых ученых, аспирантов и студентов, посвящ. 50-летию образования аграр. фак-та РУДН, Москва, 13-15 апреля 2011 г. – Москва, 2011. – С. 333–335.
67. Кургина, М. К. Опыт применения гирудотерапии в лечении гинекологических заболеваний / М. К. Кургина // Материалы VI научно-практической конференции по гирудотерапии / под ред. О. Ю. Каменева. – Санкт-Петербург, 2000. – С. 28–31.
68. Кустов, С. Ю. Медицинская пиявка в Краснодарском крае: современное состояние популяции и проблемы ее охраны / С. Ю. Кустов, О. Ю. Каменев, В. А. Ярошенко // Актуальные вопросы экологии и охраны природы экосистем южных регионов России и сопредельных территорий. – Краснодар : КубГУ. 2005. – С. 118–121.
69. Кустов, С. Ю. Оптимизация процесса выращивания медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis* L.) в искусственных условиях / С. Ю. Кустов Ю. К. Горбунова, Л. Э. Бардо // Труды Кубанского гос. аграр. ун-та. – 2014. – № 48. – С. 69–71.
70. Кучерский, В. М. Гирудотерапия болезни Пейрони / В. М. Кучерский, Б. В. Алферов, М. И. Москвин // Гирудо – 2003: материалы VIII конф. Ассоц. гирудологов России и стран СНГ / под ред. И. П. Басковой. – Москва, 2003. – С. 46–47.
71. Макаренко, И.Е. Выбор оптимального вида животных для моделирования экспериментального артериального тромбоза / И.Е. Макаренко, А.В. Калатанова, Г.В. Ванатиев, А.А. Мужикян, Е.В. Шекунова, П.В. Буренков, М.Н.Макарова, В.Г.Макаров // Международный вестник ветеринарии. 2016. -No2. -С. 116- 125.

72. Москаленко, С. А. Гирудотерапия при лечении синуситов / С. А. Москаленко // Практическая и экспериментальная гирудология: итоги за десятилетие (1991-2001 гг.) : материалы 7-й науч.-практ. конф. Ассоц. гирудологов России и стран СНГ / под ред. И. П. Басковой. – Люберцы, 2001. – С. 20–21.
73. Назарян, А. А. Влияние гепатотропной гирудотерапии на содержание церулоплазмина в венозной крови больных хронической сердечной

недостаточностью / А. А. Назарян // Практическая и экспериментальная гирудология: итоги за десятилетие (1991-2001 гг.) : материалы 7-й науч.-практ. конф. Ассоц. гирудологов России и стран СНГ / под ред. И. П. Басковой. – Люберцы, 2001. – С. 5–6.

74. Назарян, А. А. Влияние лечения медицинскими пиявками на содержание среднемолекулярных эндотоксинов в венозной крови больных сердечной недостаточностью / А. А. Назарян // Клиническая и экспериментальная гирудология на пороге нового тысячелетия : материалы 6-й науч.-практ. конф. Ассоц. гирудологов России и стран СНГ / под ред.: И. П. Басковой, А. Н. Куланина. – Пятигорск, 1999. – С. 8–9.

75. Накопление эглина с в тканях крыс с помощью тритиевой метки при оральном введении / Н. Г. Котлова [и др.] // Клиническая и экспериментальная гирудология на пороге нового тысячелетия : материалы 6-й науч.-практ. конф. гирудологов России и стран СНГ / под ред.: И. П. Басковой, А. Н. Куланина. – Пятигорск, 1999. – С. 114–116.

76. Нежданов, А. Г. Гирудопунктура для профилактики субинволюции матки у коров / А. Г. Нежданов, Л. К. Попов, И. С. Попова // Ветеринария. – 2004. – № 11. – С. 35–36.

77. Нечаев, В. И. Гирудотерапия брадитрофных зон в спортивной медицине и поликлинической практике / В. И. Нечаев, Н. А. Лесовникова // Практическая и экспериментальная гирудология: итоги за десятилетие (1991-2001 гг.) : материалы 7-й науч.-практ. конф. Ассоц. гирудологов России и стран СНГ / под ред. И. П. Басковой. – Люберцы, 2001. – С. 25–26.

78. Никонов, Г. И. Медицинская пиявка и основы гирудотерапии / Г. И. Никонов. – Санкт-Петербург : «СДС», 1998. – 294 с.

79. Никонов, Г. И. Физиологические и биохимические аспекты лечебного действия медицинских пиявок Hirudo medicinalis / Г. И. Никонов, И. П. Баскова // Успехи современной биологии. – 1986. – Т. 101, № 1. – С. 141–154.

80. Новый спектр действия пиявита - влияние на память / Л. Л. Прагина [и др.] // VI Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» : тезисы докл. – Москва, 1999. – С. 106.

81. Ноздрачев, А. Д. Физиология вегетативной нервной системы / А. Д. Ноздрачев. – Ленинград : Медицина, Ленингр. отд-ние, 1983. – 295 с. : ил.

82. Панин, И. Г. Живительная сила медицинской пиявки (Целительные практики. Энциклопедия) / И. Г. Панин. – Санкт-Петербург : Вектор, 2008. – 187 с.

83. Пирцхалава, Л. А. Гирудотерапия при некоторых дерматозах (предварительное сообщение) / Л. А. Пирцхалава, А. Я. Вартапетов, Н. И. Мирианашвили // Вестник венерологии и дерматологии. – 1941. – № 1. – С. 51–53.

84. Платонов, Е. А. Гирудотерапия в лечении послеродовых гнойно-септических заболеваний / Е. А. Платонов // Лечение медицинскими пиявками и препаратами из них : сб. ст. по материалов науч. конф. Ассоц. гирудологов 1992-1997 гг. / под ред. И. П. Басковой. – Москва, 1998. – Кн. П. – С. 3–5.

85. Подорольская, Л. В. Гемостаз и фибринолиз при наружном применении тромболитического препарата лонголитина / Л. В. Подорольская, Т. С. Шаркова, Т. Н. Серебрякова, Г. В. Андреенко // *Вестник Московского университета. Серия 16: Биология*. — 2002. — № 2. — С. 11–15.

86. Попроцкий, А. В. Гирудотерапия в профилактике церебрального инсульта / А. В. Попроцкий, В. Н. Айвазов // Клиническая и экспериментальная гирудология на пороге нового тысячелетия : материалы 6-й науч.-практ. конф. Ассоц. гирудологов России и стран СНГ / под ред.: И. П. Басковой, А. Н. Куланина. – Пятигорск, 1999. – С. 38–40.

87. Поспелова, М. Л. Возможности гирудотерапии пациентов с хронической вертебрально-базилярной недостаточностью / М. Л. Поспелова, О. Д. Барнаулов // Гирудо – 2003 : материалы VIII конф. Ассоц. гирудологов России и стран СНГ / под ред. И. П. Басковой. – Москва, 2003. – С. 35–36.

88. Поспелова М. Л. и др. Гирудотерапия в лечении цереброваскулярной патологии. История и современность //Артериальная гипертензия. – 2018. – Т. 24. – №. 2.

89. Птушкин, В. В. Применение гирудотерапии в комплексном лечении больных ИБС, нестабильной стенокардией / В. В. Птушкин, Т. Г. Лапкес // Лечение медицинскими пиявками и препаратами из них : сб. ст. по материалам науч. конф. Ассоц. гирудологов 1992-1997 гг. / под ред. И. П. Басковой. – Москва, 1998. – Кн. I. – С. 15–16.

90. Рассадина, Е. В. Экологически обоснованная биотехнология воспроизводства *Hirudo medicinalis L.* в лабораторных условиях : дис. … канд. биол. наук / Рассадина Е. В. – Ульяновск, 2006. – 199 с.

91. Результаты гирудотерапии стоматологических заболеваний по данным клинико-лабораторных исследований / С. И. Зидра [и др.] // Гирудо-2003 : материалы VIII конф. Ассоц. гирудологов России и стран СНГ / под. ред. И. П. Басковой – Москва, 2003. – С. 41–42.

92. Романова, Е. М. Эффективность использования гирудотерапии и гирудорунктуры при субклинической форме мастита у коров / Е. М. Романова, О. М. Климина // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2008. – № 3(19). – С. 252–255.

93. Савинов, В. А. Гирудотерапия в комплексном лечении больных хроническим простатитом / В. А. Савинов, В. М. Кучерский // Лечение медицинскими пиявками и препаратами из них : сб. ст. по материалам науч. конф. Ассоц. гирудологов 1992-1997 гг. / под ред. И. П. Басковой. – Москва, 1998. – Кн. I. – С. 66–68.

94. Савинов, В. А. Гирудотерапия в урологической клинике / В. А. Савинов. – Москва, 1993.

95. Сравнение изменений липидного профиля крови у больных ХИБС при гирудотерапии и трансвенозной лазеротерапии / Н. В. Азаров [и др.] // Клиническая и экспериментальная гирудология на пороге нового тысячелетия : материалы 6-й науч.-практ. конф. Ассоц. гирудологов России и стран СНГ / под ред.: И. П. Басковой, А. Н. Куланина. – Пятигорск, 1999. – С. 10–12.

96. Стояновский, Д. Н. Медицинская пиявка. Кровопускание / Д. Н. Стояновский. – Москва : АСТ ; Донецк: «Сталкер», 2003. – 125 с.

97. Сулим, Н. И. Гирудотерапия келоидных рубцов / Н. И. Сулим // Материалы пленума ассоциации травматологов и ортопедов РФ. – Самара, 1994. – С. 48–51.
98. Сулим, Н. И. Основы клинической гирудотерапии / Н. И. Сулим. – Ростов-на-Дону : Феникс. 2008. – 218 с.
99. Тихоненко О. А. Действие эффектора из секрета медицинской пиявки Hirudo medicinalis на систему комплемента человека : автореф. дис. … канд. мед. наук / Тихоненко О. А. – Чита, 2000. – 18 с.
100. Фролова, Н.Ю. Методические подходы к экспериментальному изучению дерматотропных средств / Фролова Н.Ю., Мельникова Т.И., Бурякина А.В., Вишневская Е.К., Авенирова Е.Л., Сивак К.В. и др. // Экспериментальная и Клиническая Фармакология. - 2009. - 72(5). - 56-60.
101. Халиль, С. Механизмы тромболизиса и ингибирования свертывания крови препаратами из пиявок Hirudo medicinalis : дис. … канд. биол. наук / Халиль С. – Москва, 1987. – 143 с.
102. Чалисова, Н. И. Исследование механизмов гирудотерапии в культуре нервной ткани / Н. И. Чалисова, С. Г. Журавский, В. А. Пеннияйнен // Сборник докладов VI международной конференции по иммунологии. – Санкт-Петербург, 1997. – С. 34–36.
103. Эффективность гирудотерапии в комплексной терапии НЦД у детей / Е. А. Колесникова [и др.] // Клиническая и экспериментальная гирудология на пороге нового тысячелетия : материалы 6-й науч.-практ. конф. гирудологов России и стран СНГ / под ред.: И. П. Басковой, А. Н. Куланина. – Пятигорск, 1999. – С. 73–74.
104. Юхименко, Л. Н. Биологические свойства аэромонад / Л. Н. Юхименко // Молекулярно-клеточные механизмы патогенного и иммуногенного действия *Aeromonas spp*. : сб. науч. тр. Российско-китайского семинара. – Москва, 2007. – С. 33–36.
105. A Preliminary Study of Water Quality Index in Terengganu River Basin, Malaysia / S. Suratman [et al.] // Sains Malaysiana. – 2015. – Vol. 44 (1). – P. 67–73.
106. Abdisa T. Therapeutic importance of leech and impact of leech in domestic animals //MOJ Drug Des Develop Ther. – 2018. – Т. 2. – №. 6. – С. 235-242.

107. Adamatzky A. On exploration of geometrically constrained space by medicinal leeches Hirudo verbana //Biosystems. – 2015. – T. 130. – C. 28-36.

108. Alex, R. Mechanism of ammonia excretion in the freshwater leech *Nephelopsis obscura*: characterization of a primitive Rh protein and effects of high environmental ammonia / R. Alex [et al.] // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2015. – Vol. 309. – P. 692-705.

109. Ammar A. et al. Mechanism of anticancer activity of BPS-001 (lyophilized leech saliva extract). – 2017.

110. An overview of leech and its therapeutic applications / P. Sivachandran [et al.] // Journal of Coastal Life Medicine. – 2015. – Vol. 3 (5). – P. 405–413.

111. Annelida (Clitellata): Oligochaeta, Branchiobdellida, Hirudinida, and Acanthobdellida / F. R. Govedich [et al.] // Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates / ed.: J. H. Thorp, A. P. Covich. – Amsterdam ; Boston : Academic Press, 2010. – P. 385-436.

112. Aquaculture Water Quality for Small-Scale Producers / O. Alatorre-Jácome [et al.] // Aquaculture and the Environment - A Shared Destiny / Ed. by Dr. Barbara Sladonja. – 2011. – P. 125–140. DOI: 10.5772/29141.

113. Aquaculture: global status and trends / J. Bostock [et al.] // Philosophical Transactions of the Royal Society B. – 2010. – Vol. 365, № 1554. – P. 2897–2912.

114. Atalayın I. et al. Light microscopy investigation of the immune system cells of hirudo medicinalis linnaeus, 1758 //J. Adv. Zool. – 2017. – T. 38. – №. 1. – C. 07-13.

115. Azizi M. et al. Efficacy of nano-and microemulsion-based topical gels in delivery of ibuprofen: an in vivo study //Journal of microencapsulation. – 2017. – T. 34. – №. 2. – C. 195-202.

116. Bäcker M. et al. Effectiveness of leech therapy in chronic lateral epicondylitis: a randomized controlled trial //The Clinical journal of pain. – 2011. – T. 27. – №. 5. – C. 442-447.

117. Bacterial flora of *Hirudo medicinalis* and their antibiotic sensitivities in the Middle Black Sea Region, Turkey / C. Eroglu [et al.] // Ann. Plast. Surg. – 2001. – Vol. 47, № 1. – P. 70–73.
118. Bacterial symbiont and salivary peptide evolution in the context of leech phylogeny / M. E. Siddall [et al.] // Parasitology. – 2011. – Vol. 138. – P. 1815–1827.
119. Baici, A. Kinetics of the inhibition of human leukocyte elastase by eglin from the leech *Hirudo medicinalis* / A. Baici, U. Seemüller // Biochem. J. – 1984. – Vol. 218. – P. 829–833.
120. Baranova, F. S. A novel drug from the medicinal leech suppresses lymphocyte proliferation in vitro / F. S. Baranova, L. P. Baskova, A. E. Baranov // Abstracts of 3-th International Conference of new trends in clinical and experimental immunosuppression. – Geneva, Switzerland, 1998. – P. 19 p.
121. Bhatnagar, A. Water quality guidelines for the management of pond fish culture / A. Bhatnagar, P. Devi // International journal of environmental sciences. – 2013. – Vol. 3, № 6. – P. 1980–2009.
122. Bielecki, A. Fish leeches of Poland in relation to the Palearctic piscicolines (Hirudinea: Piscicolidae: Piscicolinae) / A. Bielecki // Genus. – 1997. – Vol. 8. – P. 223–375.
123. Biochemistry and pathophysiology of human CI-Inhibitor: current Issues / M. Schapira [et al.] //Complement. – 1985. –Vol. 2. – P. 111–126.
124. Characterising organic matter in recirculating aquaculture systems with fluorescence EEM spectroscopy / A. C. Hambly [et al.] // Water Research. – 2015. – Vol. 83. – P. 112–120.
125. Chernaya L. V., Kovalchuk L. A., Nokhrina E. S. Role of the tissue free amino acids in adaptation of medicinal leeches Hirudo medicinalis L., 1758 to extreme climatic conditions //Doklady Biological Sciences. – Pleiades Publishing, 2016. – T. 466. – №. 1. – C. 42-44.

126. Craig, S. Behaviour of the three-spined stickleback, Gasterosteous aculeatus (Gasterosteidae, Teleostei) in the multispecies freshwater biomonitor: a validation of

automated recordings at three levels of ammonia pollution / S. Craig, P. Laming // Water Research. – 2004. – Vol. 38. – P. 2144–2154.
127. De Salle, R. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. / R. De Salle, M. G. Egan, M. E. Siddall // Philosophical Transactions of the Royal Society. – 2005. – Vol. 360. – P. 1905–1916.
128. Deka, P. A comparative study of the seasonal trend of Biological Oxygen Demand, Chemical Oxygen Demand and Dissolved Organic Matter in two fresh water aquaculture ponds of Assam / P. Deka // International Journal of Fisheries and Aquatic Studies. – 2015. – Vol. 3 (1). – P. 266–268.
129. Distribution and status of medicinal leeches (genus Hirudo) in the Western Palaearctic: anthropogenic, ecological, or historical effects? / S. Utevsky [et al.] // Aquat. Conserv. – 2010. – Vol. 20. – P. 198–210.
130. Diverse molecular data demonstrate that commercially available medicinal leeches are not *Hirudo medicinalis* / M. E. Siddall [et al.] // Proceedings of the Royal Society B. – 2007. – Vol. 274. – P. 1481–1487.
131. Dwiastuti R. et al. Molecular dynamics simulations and empirical observations on soy lecithin liposome preparation //Indonesian Journal of Chemistry. – 2016. – Т. 16. – №. 2. – С. 222-228.
132. Effects of broodstock density and diet on reproduction and juvenile culture of the Leech, *Hirudinaria manillensis* Lesson, 1842 / B. Zhang [et al.] // Aquaculture. – 2008. – Vol. 276. – P. 198–204.
133. Elliott, J. M. Freshwater Leeches (Hirudinea) of Britain and Ireland; Keys and a Review of their Ecology / J. M. Elliott, M. Dobson ; Freshwater Biological Association, Ambleside. – 2014. – 108 pp. – (Freshwater Biological Association, Scientific Publication ; vol. 69).
134. Elliott, J. M. Medicinal leeches: historical use, ecology, genetics, and conservation / J. M. Elliott, U. Kutschera // Freshwater Reviews. – 2011. – Vol. 4. – P. 21-41.
135. Evaluation of the aquaculture pond water quality / W. Rumei [et al.] // ASAE Annual International Meeting. – Nevada, USA. 2003. – Paper ASAE. – No. 031298.

136. Freeman M. et al. Leech (Hirudo medicinalis) therapy for the treatment of nipple-areolar complex congestion following breast reduction //Eplasty. – 2015. – T. 15.

137. Frolov A. K., Litvinenko R. A. Effect of medicinal leeches' antigens on the proliferative response of human blood mononuclear cells and cytokine production in vitro //Annals of parasitology. – 2015. – T. 61. – №. 2.

138. Girardello R. et al. Cellular responses induced by multi-walled carbon nanotubes: in vivo and in vitro studies on the medicinal leech macrophages //Scientific reports. – 2017. – T. 7. – №. 1. – C. 8871.

139. Gouda, H. A. The effect of peritrich ciliates on some freshwater leeches from Assiut / H. A. Gouda // Egypt. Journal of Invertebrate Pathology. – 2006. – Vol. 93. – P. 143–149.

140. Graf, J. Leeches and their microbiota: naturally simple symbiosis models / J. Graf, Y. Kikuchi, R. V. M. Rio // TRENDS in Microbiology. – 2006. – Vol. 14, № 8. – P. 365–371.

141. Graf, J. The effect of the symbionts on the physiology of *Hirudo medicinalis*, the medicinal leech / J. Graf // Invert. Reprod. Dev. – 2002. – Vol. 41. – P. 269–275.

142. Gunawan F. et al. Controversy: hirudotherapy (leech therapy) as an alternative treatment for osteoarthritis //Acta Medica Indonesiana. – 2015. – T. 47. – №. 2.

143. Gunawan F. et al. Controversy: hirudotherapy (leech therapy) as an alternative treatment for osteoarthritis //Acta Medica Indonesiana. – 2015. – T. 47. – №. 2.

144. Halachmi, I. Systems engineering for ornamental fish production in a recirculating aquaculture system / I. Halachmi // Aquaculture. – 2006. – Vol. 259. – P. 300–314.

145. Harley, C. M. Developmentally regulated multisensory integration for prey localization in the medicinal leech / C. M. Harley, J. Cienfuegos, D. A. Wagenaar // The Journal of Experimental Biology. – 2011. – Vol. 214. – P. 3801–3807.

146. Hechtel, F. O. P. Toward a taxonomic revision of the medicinal leech *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758 (Hirudinea: Hirudinidae): re-description of *Hirudo troctina* Johnston, 1816 from North Africa / F. O. P. Hechtel, R. T. Sawyer // Journal of Natural History. – 2002. – Vol. 36. – P. 1269–1289.

147. Historical Article: *Hirudo medicinalis*: ancient origins of, and trends in the use of medicinal leeches throughout history / I. S. Whitaker [et al.] // British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. – 2004. – Vol. 42. – P. 133–137.
148. Hitchhiking of host biology by beneficial symbionts enhances transmission / B. M. Ott [et al.] // Sci. Rep. – 2014. – Vol. 4. – P. 5825. doi: 10.1038/srep05825
149. Houschyar K. S. et al. Medical leech therapy in plastic reconstructive surgery //Wiener Medizinische Wochenschrift. – 2015. – Т. 165. – №. 19-20. – С. 419-425.
150. Iqbal A. et al. Management of chronic non-healing wounds by hirudotherapy //World journal of plastic surgery. – 2017. – Т. 6. – №. 1. – С. 9.

151. Isik M. et al. Comparison of the effectiveness of medicinal leech and TENS therapy in the treatment of primary osteoarthritis of the knee //Zeitschrift für Rheumatologie. – 2017. – Т. 76. – №. 9. – С. 798-805.
152. Iveson-Iveson, J. Leeches in medicine / J. Iveson-Iveson // Nursing Mirror. – 1978. – Vol. 22. – P. 8–9.
153. Jar anatomy of the blood – sucking leeches, *Hirudinea Limnatis nilotica* and *Hirudo medicinalis*, and its relationship to their feeding habits / M. Overy [et al.] // J. Zoo. London. – 2000. – Vol. 250. – P. 121–127.
154. Kampmann M. L. et al. Leeches as a source of mammalian viral DNA and RNA—a study in medicinal leeches //European journal of wildlife research. – 2017. – Т. 63. – №. 2. – С. 36.

155. Koeppen D., Aurich M., Rampp T. Medicinal leech therapy in pain syndromes: a narrative review //Wiener Medizinische Wochenschrift. – 2014. – Т. 164. – №. 5-6. – С. 95-102.
156. Kutschera, U. Hilfreiche Blutsauger in der Medizin und ihre Systematik / U. Kutschera // Biologie in unserer Zeit. – 2012b. –Vol. 42 (6). – P. 352–353.
157. Kutschera, U. Species concepts: leeches versus bacteria / U. Kutschera // Lauterbornia. – 2004. – Vol. 52. – P. 171–175.

158. Kutschera, U. The European medicinal leech Hirudo medicinalis L.: Morphology and occurrence of an endangered species / U. Kutschera, J. M. Elliott // Zoosyst. Evol. – 2014. – Vol. 91, № 2. – P. 271–280.
159. Kutschera, U. The Hirudo medicinalis species complex / U. Kutschera // Naturwissenschaften. – 2012a. –Vol. 99. – P. 433–434.
160. Kutschera, U. The infamous bloodsuckers from Lacus Verbanus. / U. Kutschera // Lauterbornia. – 2006. – Vol. 56. – P. 1–4.
161. Lee Z. H. et al. Quantifying outcomes for leech therapy in digit revascularization and replantation //Journal of Hand Surgery (European Volume). – 2019. – С. 1753193418823595.
162. Leech therapy for symptomatic relief of cancer pain / M. E. Kalender [et al.] // Pain Med. – 2010. – № 11. – P. 443–445.
163. Lui C., Barkley Jr T. W. Medicinal leech therapy: New life for an ancient treatment //Nursing2018. – 2015. – Т. 45. – №. 11. – С. 25-30.
164. Manzano-Marın, A. Solving a Bloody Mess: B-Vitamin Independent Metabolic Convergence among Gammaproteobacterial Obligate Endosymbionts from Blood-Feeding Arthropods and the Leech *Haementeria officinalis* / A. Manzano-Marın [et al.] // Genome Biol. Evol. – 2015. –Vol. 7, № 10. – P. 2871–2884.
165. Massart D., Sohawon S., Noordally O. Medicinal leeches //Revue medicale de Bruxelles. – 2009. – Т. 30. – №. 5. – С. 533-536.
166. Meng Z., Huang R. Topical treatment of degenerative knee osteoarthritis //The American journal of the medical sciences. – 2018. – Т. 355. – №. 1. – С. 6-12.
167. Merzouk A. et al. Whole, leech saliva product and applications thereof : пат. 8685462 США. – 2014.
168. Metagenomic Analysis of the Medicinal Leech Gut Microbiota / M. A. Maltz [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2014. – Vol. 5. – P. 151.
169. Moffat A. D., Weaver L. K., Tettelbach W. H. Compromised breast flap treated with leech therapy, hyperbaric oxygen, pentoxifylline and topical nitroglycerin: A case report //Undersea & hyperbaric medicine: journal of the Undersea and Hyperbaric Medical Society, Inc. – 2015. – Т. 42. – №. 3. – С. 281-284.

170. Mu J. S. Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats / J. S. Mu, W. P. Li, X. F. Zhou // Brain Res. – 1999. – Vol. 835. – C. 259–265.
171. Müller C. et al. More than just one: multiplicity of hirudins and hirudin-like factors in the medicinal leech, Hirudo medicinalis //Molecular genetics and genomics. – 2016. – T. 291. – №. 1. – C. 227-240.

172. Nelissen J.L., de Graaf L., Traa W.A., Schreurs T.J., Moerman K.M., Nederveen A.J., et al. (2017) A MRI-Compatible Combined Mechanical Loading and MR Elastography Setup to Study Deformation-Induced Skeletal Muscle Damage in Rats. PLoS ONE 12(1): e0169864. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169864

173. Nelson, M. C. Mucinivorans hirudinis gen. nov., sp. nov., an anaerobic, mucin-degrading bacterium isolated from the digestive tract of the medicinal leech *Hirudo verbena* / M. C. Nelson [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2015. – Vol. 65. – P. 990–995.
174. Neun B. W., Dobrovolskaia M. A. Considerations and some practical solutions to overcome nanoparticle interference with LAL assays and to avoid endotoxin contamination in nanoformulations //Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery. – Humana Press, New York, NY, 2018. – C. 23-33.
175. New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: a perspective on environmental sustainability / C. I. M. Martinsa [et al.] // Aquacultural Engineering. – 2010. – Vol. 43, № 3. – P. 83–93.
176. Ng A. Hirudotherapy: a guide to using leeches to drain blood from tissue //Prevention. – 2019. – T. 14. – C. 03.

177. Nicolaides, A. N. Clinical results with direct thrombin inhibitors / A. N. Nicolaides // Patho-physiol Haemost Thromb. – 2002. – Vol. 32, Suppl 3. – P. 36–38.
178. Nikonov G. I., Titova E. A., Lebedeva A. O. Extract of Hirudo medicinalis leeches: biogenic substance for the creation of effective drugs //Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologiia. – 2015. – T. 78. – №. 2. – C. 15-19.

179. Ojo P. O. et al. Anti-Tubercular Activities and Molecular Characterization of Salivary Extract of Leech (Hirudo medicinalis) against Mycobacterium tuberculosis //Journal of Tuberculosis Research. – 2018. – Т. 6. – №. 01. – С. 1.

180. Orevi, M. Jar anatomy of the blood - sucking leeches, Hirudinea Limnatis nilotica and Hirudo medicinalis, and its relationship to their feeding habits / M. Orevi, A. Eldor, M. Rigbi // J Zoo London. – 2000. – Vol. 250. – P. 121–126.

181. Osmoregulation and excretion / Larsen E. H. [et al.] // Compr. Physiol. –2014. – Vol. 4. – P. 405–573.

182. Pavlova I. B. et al. Sensitivity of mycobacterium smegmatis to antibiotic effect of saliva cells secretion of medical leech hirudo medicinalis //International Journal of Applied and Fundamental Research. – 2016. – №. 6. – С. 15-15.

183. Perrier Q. et al. Réflexion pluri-professionnelle pour la promotion du bon usage des sangsues en établissement de santé //Le Pharmacien Hospitalier et Clinicien. – 2018. – Т. 53. – №. 4. – С. 301-305.

184. Petrauskiene, L. Can different species of medicinal leeches (Hirudo spp.) interbreed? / L. Petrauskiene, O. Utevska, S. Utevsky // Invertebr. Biol. – 2009. – Vol. 128. – P. 324–331.

185. Phillips, A. J. Polyparaphyly of Hirudinidae: many lineages of medicinal leeches / A. J. Phillips, M. E. Siddall // BMC Evolutionary Biology. – 2009. – Vol. 9. – P. 246–257.

186. Piyavit-a complex preparation from the medicinal leech improves blood rheology and decreases platelet aggregation / M. V. Kameneva [et al.] // Clinic Hemorheology. – 1995. – Vol. 15. – P. 633–640.

187. Proteins and peptides of the salivary gland secretion of medicinal leeches *Hirudo verbana*, *H. medicinalis*, and *H. orientalis.* / I. P. Baskova [et al.] // Biochemistry (Moscow). – 2008. – Vol. 73. – P. 315–320.

188. Purification and partial characterization of the PAF antagonist from the saliva of the leech hirudo medicinalis / M. Orevi [et al.] // Platelet-activating factor and related lipid mediators-2 / ed. Nigam [et al.]. – New York : Plenum Press, 1996. – P. 73–77.

189. Qi P. et al. The biological activity of cationic liposomes in drug delivery and toxicity test in animal models //Environmental toxicology and pharmacology. – 2016. – T. 47. – C. 159-164.
190. Recirculating aquaculture systems, 2nd Edition / M. B. Timmons [et al.]. – Cayuga Aqua Ventures Llc, 2002. – 769 p.
191. Recombinant hirudin for unstable angina pectoris / E. J. Topol [et al.] // A multicenter, randomized angiographic trial. Circulation. – 1994. – Vol. 89. – P. 1557–1566.
192. Ross, M. S. The leech: of dermatologic interest? (letter) / M. S. Ross // Arch. Dermatol. – 1983. – Vol. 119 (4). – P. 276–277.
193. Sergeeva S. S., Laktionova A. A., Fomina N. Y. Effects of Nimodipine, Calcium-Free Medium and Colchicine on Electrogenesis of Neurosecretory Retzius Cells in the Leech Hirudo medicinalis //Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. – 2018. – T. 54. – №. 4. – C. 332-337.
194. Shakouri A. et al. Effectiveness of topical gel of medical leech (Hirudo medicinalis) saliva extract on patients with knee osteoarthritis: A randomized clinical trial //Complementary therapies in clinical practice. – 2018. – T. 31. – C. 352-359.

195. Shakouri A. et al. Effectiveness of topical gel of medical leech (Hirudo medicinalis) saliva extract on patients with knee osteoarthritis: A randomized clinical trial //Complementary therapies in clinical practice. – 2018. – T. 31. – C. 352-359.
196. Sherman R. A., Cooper E. L. Biotherapy: Medicinal Maggots and Invertebrate Immunology from the Clinician’s Perspective //Advances in Comparative Immunology. – Springer, Cham, 2018. – C. 991-995.
197. Singh, A. P. Medicinal leech therapy (hirudotherapy) a brief overview / A. P. Singh // Complementary Therapies in Clinical Practice. – 2010. – Vol. 16 (4). – P. 213–215.
198. Sket, B. Global diversity of leeches (Hirudinea) in freshwater / B. Sket, P. Trontelj // Hydrobiologia. – 2008. – Vol. 595. – P. 129–137.
199. Spear M. Medicinal leech therapy: Friend or foe //Plastic Surgical Nursing. – 2016. – T. 36. – №. 3. – C. 121-125.

200. Spencer, W. The captive breeding and educational display of the Medicinal leech *Hirudo medicinalis* (Linnaeus 1758) at Bristol Zoo Gardens / W. Spencer, G. Jones // Int. Zoo Yb. – 2007. – Vol. 41. – P. 138–144.
201. Stange R. et al. Randomised controlled trial with medical leeches for osteoarthritis of the knee //Complementary therapies in medicine. – 2012. – Т. 20. – №. 1-2. – С. 1-7.
202. Stephen, C. Behaviour of the three-spined stickleback, *Gasterosteous aculeatus* (Gasterosteidae, Teleostei) in the multispecies freshwater biomonitor: a validation of automated recordings at three levels of ammonia pollution / C. Stephen, P. Laming // Water Research. – 2004. – Vol. 38. – P. 2144–2154.
203. Symbiont succession during embryonic development of the European medicinal leech, *Hirudo verbena* / R. V. M. Rio [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – Vol. 75. – P. 6890–6895.
204. Tessler M. et al. Marine leech anticoagulant diversity and evolution //The Journal of parasitology. – 2018. – Т. 104. – №. 3. – С. 210-220.
205. Tosi, M. F. Innate immune responses to infection / M. F. Tosi // J. Allergy Clin. Immunol. – 2005. – Vol. 116. – P. 241–249.
206. Trontelj, P. Celebrity with a neglected taxonomy: molecular systematics of the medicinal leech (genus *Hirudo*) / P. Trontelj, S. Y. Utevsky // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2005. – Vol. 34. – P. 616–624.
207. Trontelj, P. Phylogeny and phylogeography of medicinal leeches (genus Hirudo): Fast dispersal and shallow genetic structure / P. Trontelj, S. Y. Utevsky // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2012. – Vol. 63. – P. 475–485.
208. Utevsky, S. Y. A new species of the medicinal leech (Oligochaeta, Hirudinida, *Hirudo*) from Transcaucasia and an identification key for the genus Hirudo / S. Y. Utevsky, P. Trontelj // Parasitol. Res. – 2005. – Vol. 98. – P. 61–66.
209. Water quality index study in Paka River basin, Terengganu (in Malay) / S. Suratman [et al.] // Sains Malaysiana. – 2009. – Vol. 38. – P. 125–131.
210. Whitaker I. S., Elmiyeh B., Wright D. J. Hirudo medicinalis: the need for prophylactic antibiotics //Plastic and reconstructive surgery. – 2003. – Т. 112. – №. 4. – С. 1185-1186.

211. Wollina U., Heinig B., Nowak A. Medical leech therapy (Hirudotherapy) //Our Dermatology Online. – 2016. – T. 7. – №. 1. – C. 91.
212. Wollina U., Heinig B., Nowak A. Medical leech therapy (Hirudotherapy) //Our Dermatology Online. – 2016. – T. 7. – №. 1. – C. 91.
213. Worthen, P. L. Culture-independent characterization of the digestive-tract microbiota of the medicinal leech reveals a tripartite symbiosis / P. L. Worthen, C. J. Gode, J. Graf // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 72 (47). – P. 7