

РОЗДІЛ I. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ТА ДОСЛІДНИЦЬКІ СТАТТІ

УДК 612.017: 591.5

DOI <https://doi.org/10.26661/2410-0943-2019-1-01>

Вплив ендоксану на імунну систему щурів

Амінов Р. Ф., Фролов О. К., Амінова А. С., Гранкіна А. О., Свириденко А. П.

ORCID iD 0000-0002-8471-1525

Запорізький національний університет, Україна

91_amin_91@ukr.net; a_frolov@ukr.net

Ключові слова:

цитостатики, ендоксан, імунodefіцит, імунітет, циклофосфамід

Циклофосфамід – цитостатичний препарат, який широко застосовується при лікуванні онкологічних, аутоімунних захворювань, використовується для профілактики відторгнення трансплантатів, також його використання викликає загальний імунodefіцитний стан. Зараз випускається аналог циклофосфаміду – ендоксан, застосування якого для викликання імунodefіциту в літературі мало описане. Тому метою нашої роботи став підбір доз ендоксану, активною речовиною якого є циклофосфамід, для отримання оптимальної імуносупресії. Експериментальні досліді з тваринами проведені з дотриманням Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою». Усі досліді проводили на білих нелінійних щурах масою 390-430 г на момент відбору. Для моделювання імуносупресії в дослідних групах використовували протипухлинний засіб «Ендоксан», порошок для приготування розчину для ін'єкцій (200 мг), виготовлений фірмою «Baxter Oncology GmbH» (Німеччина), його вводили внутрішньочеревно самцям щурів. Для цього було сформовано 4 групи тварин: 1) контроль; 2) доза 50 мг / кг (у 2 рази); 3) доза 100 мг / кг; 4) доза 150 мг / кг. Тварин обстежували на 22 добу. Згідно з отриманими експериментальними даними доза ендоксану 100 мг/кг може розглядатися як мінімально достатня доза цього препарату, яка дозволяє досягти стану імуносупресії у нелінійних щурів за такими критеріями, як статистично вірогідне зниження ваги тимусу та селезінки, зміна морфології тимусу, лейкопенія і лімфопенія, а також зниження фагоцитарної активності циркулюючих нейтрофілів. При дозі 150 мг/кг у тимусі відбувалося майже повне апоптотичне спустошення основної паренхіми органа із заміною її на жирову та сполучну тканину. Доза препарату – 50мг/кг ендоксану індукує нестійку імуносупресію.

Effect of endoxane on the immune system of rats

Aminov R. F., Frolov A. K., Aminova A. S., Grankina A. A., Sviridenko A. P.

Zaporizhzhia National University, Ukraine

Key words:

cytostatics, endoxan, immunodeficiency, immunity, cyclophosphamide

Cyclophosphamide (Endoxane) is a cytostatic drug that is widely used in the treatment of cancer, from autoimmune diseases. It is used to prevent transplant rejection by inducing a common immunodeficiency state. An important unsettled issue is absence of optimal doses of this drug to obtain an immunosuppressive model. Therefore, the purpose of our work was to found the respective concentration of endoxane to obtain optimal immunosuppression. Experiments with animals have been conducted according to the Law of Ukraine «On the Protection of Animals from Cruelty» and the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. All experiments with animals were performed on white non-linear rats weighing 390-430 grams. For the simulation of immunosuppression in the experimental groups antitumor agent Endoxan was used (powder for preparation of solution for injection 200 mg, manufactured by "Baxter Oncology GmbH" (Germany)).

Endoxan was administered intraperitoneally to male rats. For this purpose 4 groups of animals were treated: 1) injected with saline; 2) a dose of 50 mg/kg (2 times); 3) a dose of 100 mg/kg; 4) a dose of 150 mg/kg. Animals were examined at 22 days postinjection. According to our experimental data, the single injection of 100 mg/kg of Endoxane can be considered as the minimum sufficient dose of this drug to achieve immunosuppression in non-linear rats by such criteria as statistically significant reduction in thymus and spleen weight, change in thymus morphology, leukopenia also reduction of phagocytic activity of circulating neutrophils the dose of 150 mg/kg for treated rats leads to almost complete apoptotic destruction of the main parenchyma of the thymus with its replacement by adipose and connective tissue. A dose of 50mg/kg of Endoxane induces unstable immunosuppression and therefore does not meet our research objectives.

Вступ

Наслідком погіршення екологічного стану навколишнього середовища є збільшення кількості імуносупресивних станів різної етіології, що своєю чергою стимулює пошук нових препаратів, які б могли коригувати ці патології. Перевірка нових препаратів на імуномодулюючу дію потребує розроблення оптимальних моделей імуносупресії, які б могли дати детальну відповідь на імунокорекцію. Тому перед дослідниками постає основне завдання – створити в доклінічних випробуваннях умови імуносупресивного стану, який би міг піддаватися імунокорекції. Зараз найчастіше використовують хімічну модель імунодефіциту, викликану за допомогою цитостатиків, наприклад, циклофосфаміду¹⁻⁷. Модель імунодефіциту, отриманого циклофосфамідом, є найбільш точною для вивчення особливостей реактивності органів імунної системи¹⁻¹³. Циклофосфамід – цитостатичний препарат, який широко застосовується при лікуванні онкологічних, аутоімунних захворювань²⁻⁴, використовується для профілактики відторгнення трансплантатів. Його використання також викликає загальний імуносупресивний стан¹⁻⁷. Багато дослідників доводять, що цитостатики можуть викликати імуносупресію, яка може піддаватися імунокорекції. Зараз учені розділилися на дві різні групи, перші говорять, що малі концентрації можуть увести тварину в імуносупресивний стан⁷⁻¹³, інші, – що при одноразовому введенні максимальних концентрацій найефективніше можна отримати імунодефіцит¹⁻⁶. Але зараз випускається аналог циклофосфаміду – ендоксан, дія якого мало вивчена. Окрім того, фірмові

особливості виробників цього препарату обов'язково потребують вивчення.

Метою роботи є підбір дози ендоксану, активною речовиною якого є циклофосфамід, для отримання оптимальної імуносупресії.

Матеріали та методи

Дослідження виконані в межах кафедральної теми «Біотехнологія перспективних кільцеців з вивченням імунотропної дії їх біологічно активних речовин» (№ держреєстрації 0117U000704) кафедри фізіології, імунології і біохімії з курсом цивільного захисту та медицини ЗНУ. Експериментальні досліди з тваринами проведені з дотриманням Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006 р.), Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою». Усі досліди проводили на 80 білих нелінійних статевозрілих самцях щурів масою на момент відбору 390-430 г, віком 12-13 місяців.

Для моделювання імуносупресії в експериментальних групах тварин використовували «Ендоксан», – порошок для приготування розчину для ін'єкцій (по 200 мг, виробництво «Вахтер Oncology GmbH» (Німеччина)), який готували на фізіологічному розчині. Його вводили внутрішньочеревно статевозрілим самцям щурів після формування 4 дослідних груп по 20 тварин у кожній: 1) контроль; 2) ендоксан у дозі 50 мг/кг (1 раз на добу: 2 рази); 3) ендоксан у дозі 100 мг/кг (одноразово на добу); 4) ендоксан у дозі 150 мг/кг (одноразово на добу).

У тварин протягом 22 діб оцінювали наявність смертності; зовнішній вигляд

шкіри та шерсті. Дослідження шерстяного покриву та шкіри проводили за допомогою огляду. У здорових тварин при повноцінній годівлі й добрих умовах утримання шерстний покрив густий, гладенький, щільно прилягає до шкіри. При дослідженні тварин проводилася оцінка показників зовнішнього вигляду шкіри: порушення цілісності, шкірні висипи¹⁴. На 22 добу тварин після дислокації шийних хребців декапітували. Брали кров із додаванням антикоагулянту – 2 % гепарину (9/1). Після цього досліджували гематологічні показники за загальноприйнятими методами в камері Горяєва та імунологічні показники: постановку фагоцитарної активності нейтрофілів за модифікованим нами методом¹⁵. На білковані предметні скельця наносили цільну кров, стабілізовану гепарином в обсязі 200 мкл, додавали до неї приготувану 1% суспензію дріжджів у співвідношенні 1:1. Після цього суміш інкубували у вологій камері в термостаті при температурі 37°C, впродовж 90 хв в умовах струшування, після інкубації предметні скельця обережно занурювали у 2 порції фосфатно-сольового розчину при рН 7,4, висушували їх на повітрі при кімнатній температурі, фіксували протягом 10 хв у метанолі, фарбували предметні скельця 15% розчином фарби Романовського-Гімзи протягом 40 хв. Підраховували 200 нейтрофілів за допомогою мікроскопа з використанням імерсійного об'єктива (об'єктив 100×, окуляр К7×. Підраховували кількість фагоцитів із дріжджами та без них, також урахували кількість поглинутих дріжджів на 1 нейтрофіл. Вивчали такі показники фагоцитарної активності нейтрофілів: фагоцитарний індекс (ФІ) – відсоток нейтрофілів, які беруть участь у фагоцитозі, від їх загальної кількості; фагоцитарне число (ФЧ) – середня кількість мікроорганізмів, поглинутих одним нейтрофілом. Видалені лімфоїдні органи після зважування фіксували в 10% розчині формаліну у посуді із затемненим склом, зберігали при кімнатній температурі 3 доби до початку гістологічних дослідів. Далі тимус за стандартною гістологічною методикою заливали в парафінові блоки, із яких виготовляли мікротомні серійні зрізи

товщиною 6 мкм. Серійні зрізи робили з використанням мікротому Thermo Scientific HM 325 та фарбували гематоксилін-еозином за стандартною методикою^{16,17}. Морфометричні та цитологічні дослідження проводили безпосередньо на гістологічних препаратах із використанням мікроскопа Carl Zeiss Primo Star. За допомогою мікроскопа PrimoStar iLED та фотокамери Axio CamERc5s («ZEISS», Німеччина), готували мікрофотографії, які були проаналізовані програмою для мікроскопії ZEISS ZEN 2011.

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою комп'ютерної програми SPSS v.21,0. (IBM SPSS Statistics, USA). Вибіркові параметри, наведені далі в таблиці, мають такі позначення: X – вибіркоче середнє, SE – стандартна помилка середнього. Вірогідність відмінностей між середніми величинами оцінювали за критерієм Ст'юдента після перевірки на нормальний розподіл. Різниці вважали достовірними при $p < 0,05$.

Результати

Уже на перший день експерименту дослідні тварини 3-ї та 4-ї груп після введення препарату ендоксан виглядали сонливими та в'ялими порівняно з контрольною групою тварин. Починаючи з 2 доби, у 3-ї та 4-ї групи тварин – шерсть дибки, особливо у 4-ї групи тварин порівняно з контролем. На 3 добу у всіх дослідних групах тварини сонливі та в'ялі порівняно з контролем. У 4-ї групи на 4 добу з'являється агресивність, яка проявляється нападами на дослідника при годуванні. На 6 добу в 4-ї та на 7 добу в 3-ї групи починає випадати шерсть, а на місці випадіння залишаються свіжі та засохлі рани (рис. 1). Тварини 4-ї групи залишаються агресивними до 17 доби.

При аналізі ваги тіла виявили, що у всіх дослідних групах вона знижувалася порівняно з контролем у середньому на 14% (таблиця 1). На 22 добу дослідження зареєстроване зниження ваги селезінки у 3-ї та 4-ї груп порівняно з контрольною $p < 0,05$. При зовнішньому огляді селезінки тварин, що отримали препарат у дозі 150 мг/кг, спостерігалася її деформація у вигляді скручування одного краю (рис. 2).



Рис. 1. Рани після випадіння шерсті на 7 добу: а – ендоксан (доза препарату 100 мг/кг); б – ендоксан (доза препарату 150 мг/кг), стрілками позначені ранки після випадіння шерсті

Таблиця 1 – Зміни ваги тіла та лімфоїдних органів на 22 добу

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

Примітка: * – показники, що достовірно відрізняються від контролю ($p < 0,05$).



Рис. 2. Зовнішній вигляд селезінки: білою стрілкою позначена деформація

При гістологічному аналізі лімфоїдного органа (тимусу) при дозі препарату ендоксану 50 мг/кг (1 раз на добу: 2 рази) він майже не відрізняється від контрольної групи (рис. 3 (1, 2, 3, 4)). При дозі препарату 100 мг/кг нормальні тканини тимусу заміщені жирною та сполучною (рис. 3 (5, 6)). Уведення дози препарату

150 мг/кг ендоксану сприяє повному заміщенню нормальної тканини на жирону та сполучну (рис. 3 (7, 8)).

При аналізі загальної кількості лейкоцитів та еритроцитів, показники статистично знижені, особливо при дозі ендоксану 150 мг/кг $p < 0,05$ (табл. 2).

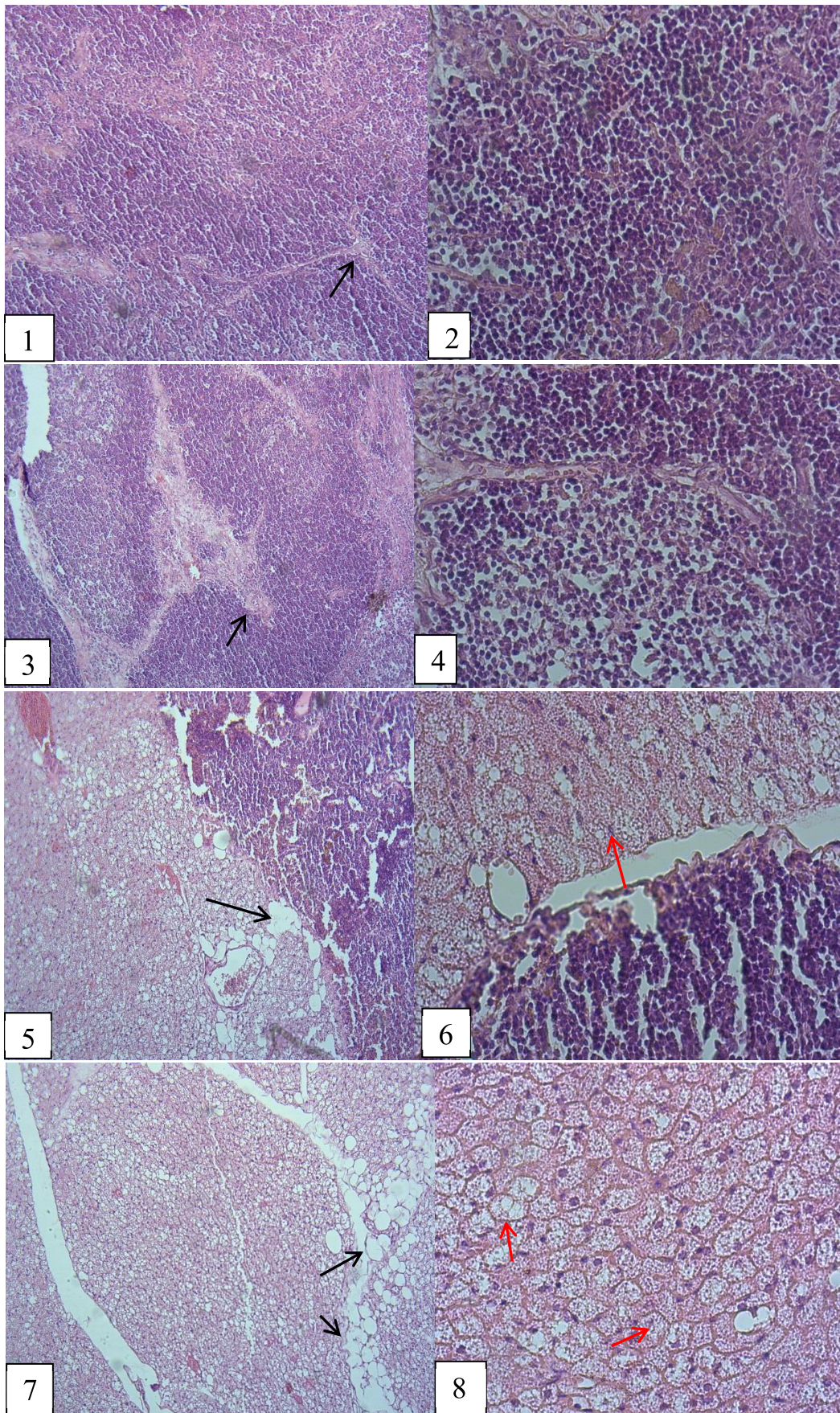


Рис. 3. Гістологічний препарат тимусу: 1, 2 – контрольна група; 3, 4 – доза препарату 50 мг/кг; 5, 6 – доза препарату 100 мг/кг; 7, 8 – доза препарату 150 мг/кг. (1, 3, 5, 7 збільшення – $\times 200$; 2, 4, 6, 8 – $\times 600$), червоними стрілками позначено сполучну тканину, а чорними – жирову тканину, яка замінила лімфоїдну тканину.

Таблиця 2 – Загальна кількість еритроцитів та лейкоцитів/л на 22 добу

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

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

При аналізі відносної кількості в лейкоцитарній формулі крові порівняно з контролем у всіх дослідних групах тварин виявлене різке зниження лімфоцитів, у середньому на 17 %, при відповідному підвищенні сегментоядерних нейтрофілів

(54,7 %) та їхніх незрілих паличкоядерних форм (77,8 %) $p \leq 0,05$ (табл. 3). Абсолютна кількість нейтрофілів збільшується зі зниженням абсолютної кількості лімфоцитів та еозинофілів порівняно з контролем $p \leq 0,05$ (табл. 3).

Таблиця 3 – Лейкоцитарна формула крові та загальна кількість лейкоцитів

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

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

При аналізі фагоцитарної активності нейтрофілів (рис. 4) із збільшенням дози цитостатика виявлене різке зниження фагоцитарного індексу порівняно з контрольною групою: при дозі ендоксану 50 мг/кг (1 раз на добу: 2 рази) на 66,0 %, при дозі ендоксану 100 мг/кг на 74,1 %, при дозі ендоксану 150 мг/кг 87,2 % $p \leq 0,05$ таблиця 4.

Починаючи з дози ендоксану 100 мг/кг, фагоцитарне число нейтрофілів знижується порівняно з контрольною групою в середньому на 19,9 %, а при дозі ендоксану 150 мг/кг – на 44,5 % (табл. 4).

Обговорення

Отримані результати збігаються з даними інших дослідників щодо використання

циклофосфаміду та лікарських засобів на його основі, які насамперед інгібують лімфоїдну тканину^{12,13}. Цитотоксична дія ендоксану базується на взаємодії між алкілюючими метаболітами і ДНК. Це алкілювання призводить до розриву та перехресного з'єднання поперечних зв'язків ниток ДНК та ДНК-білків. Унаслідок цього в клітинному циклі сповільнюється перебіг фази G2 та блокується подальше проходження мітотичного циклу, у результаті клітини апоптозуються^{18,19}. У разі тимусу (який є центральним лімфоїдним органом), ці обставини викликають його апоптотичне спустошення, які також можуть бути і в Т-зонах периферичних лімфоїдних органів¹³.

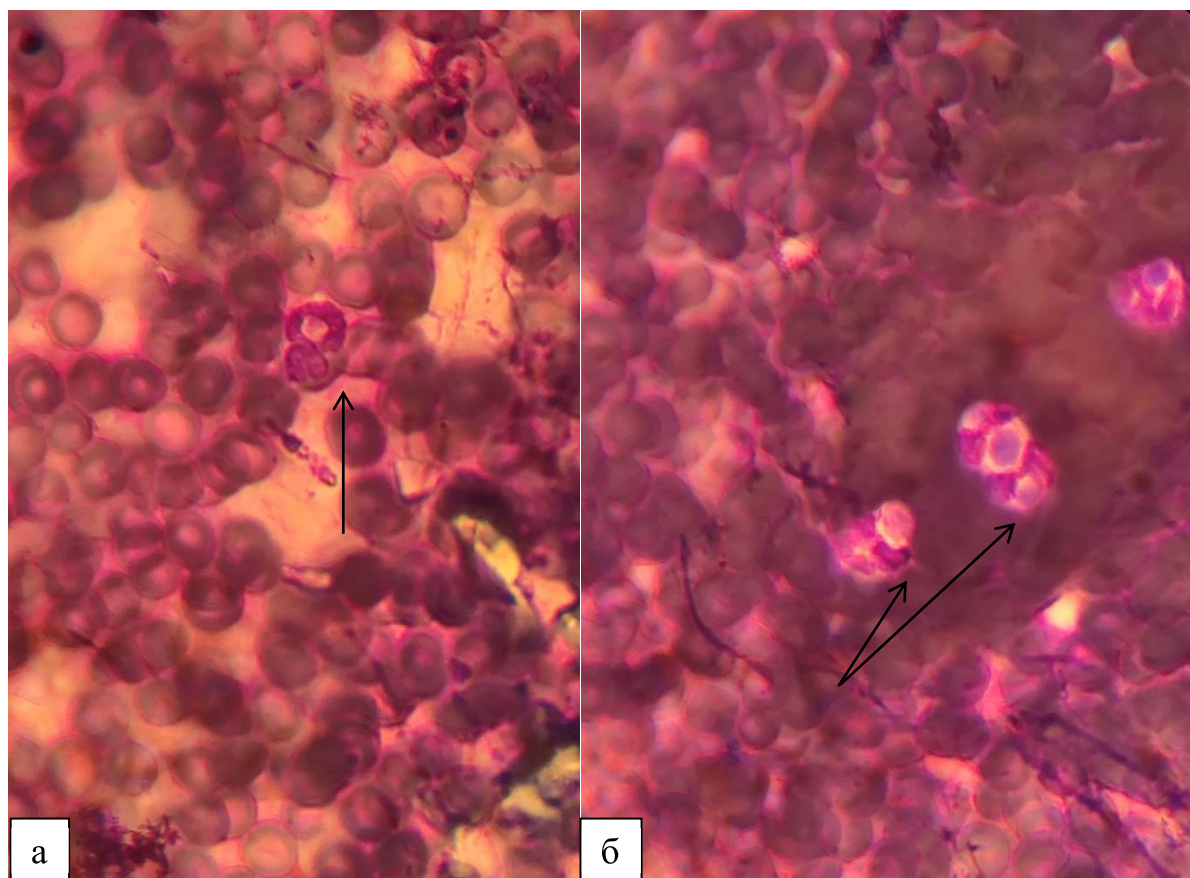


Рис. 4. Нейтрофіли на 22 добу: а – не фагоцитуючий; б – фагоцитуючий; чорними стрілками позначено сам нейтрофіл

Таблиця 4 – Зміна фагоцитарної активності нейтрофілів на 22 добу

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

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

У результаті в периферичній крові ми спостерігали зменшення кількості лейкоцитів, в основному за рахунок зниження лімфоцитів при адекватному збільшенні основних гранулоцитів – нейтрофілів. Проте слід зазначити, що й мієлоїдна тканина піддається негативному впливу цього цитостатика, про що свідчить різке значне зниження кількості еритроцитів та еозинофілів, а також значне зрушення диференціювання нейтрофільних гранулоцитів із появою незрілих паличкоядерних форм, при загальному збільшенні їх рециркуляції у внутрішньому середовищі. Нейтрофільний зсув вліво

відбувався за рахунок їх підвищеної цитотоксичної загибелі, а також у результаті їх підвищених витрат на виконання функціональних властивостей при локальних та системних запальних реакціях²⁰. Останнім часом установлена філогенетична інтегральна єдність вродженого та адаптивного імунітету, яка ґрунтується на наявності патернів на біополімерах та патернрозпізнавальних рецепторів²¹, кількісні зміни лейкоцитів супроводжуються порушенням і їхньої функції, що і було встановлено в наших експериментах. Так, фагоцитарний індекс і фагоцитарне число основних

фагоцитуючих клітин вродженого імунітету – нейтрофілів, у дослідних групах тварин різко знижувалися. Отже, негативна динаміка імунологічних показників після введення різних доз ендоксану свідчила про адекватність вибраного нами фармакологічного препарату за механізмом його дії, як цитостатику, для отримання імуносупресії. Також згідно з дослідженнями інших дослідників^{1,3,22} дія циклофосфаміду продовжується на протязі місяця, після чого його ефект поступово знижується, а сам препарат поступово виводиться із організму. У наших наступних дослідах постає завдання: корекція імуносупресивного стану нашими природними препаратами до 22 доби, тому і було обрано саме 22 добу.

Висновки

Згідно з отриманими експериментальними даними доза ендоксану 100 мг/кг може розглядатися як мінімально достатня доза цього препарату, яка дозволяє досягти стану імуносупресії у нелінійних шурів за такими критеріями, як статистично вірогідне зниження ваги тимусу та селезінки, зміна морфології тимусу, лейкопенія і лімфопенія, а також зниження фагоцитарної активності циркулюючих нейтрофілів. При дозі 150 мг/кг у тимусі відбувалося заміщення основної паренхіми органа на жирову та сполучну тканину, що може бути наслідком апоптичної загибелі тимоцитів. Доза ендоксану 50 мг/кг індукує нестійку імуносупресію.

Література

- (1) Кащенко, С. А. Экспериментальное Изучение Крыс После Воздействия Циклофосфаном. *Проблеми остеології* **2001**, 4 (1-2), 69–70.
- (2) Мнєк, Т. А.; Воейкова, И. М.; Юдина, О. Ю.; Мосиенко, В. С.; Шинкаренко, Л. Н.; Савцова, З. Д. Влияние Иммуномодулятора из *Lactobacillus delbrueckii* на Терапевтическую Эффективность Циклофосфамида у Мышей с Карциномой Льюис. *Экспериментальная онкология* **2000**, 22, 211–214.
- (3) Кащенко, С. А.; Бобрышева, И. В. Особенности Гистологического Строения Белой Пульпы Селезенки Крыс в Разные Периоды Постнатального Онтогенеза в Условиях Экспериментальной Иммуносупрессии. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета* **2014**, 1, 51–54.
- (4) Князева, О. А.; Уразаева, С. И.; Конкина, И. Г.; Саптарова, Л. М.; Газдалиева, Л. М.; Муринов, Ю. И. Антииммуносупрессивное Действие Глюконатов 3d-Металлов при Экспериментальном Иммунодефиците. *Казанский медицинский журнал* **2018**, 99 (2), 255–259. <https://doi.org/10.17816/KMJ2018-255>.
- (5) Бобрышева, И. В. Морфологические Особенности Белой Пульпы Селезенки Крыс в Условиях Экспериментальной Иммуносупрессии. *Молодий вчений*. **2015**, 2(17), 581–585.
- (6) Бобрышева, И. В. Изменения Ультраструктуры Тимуса Белых Крыс После Введения Циклофосфамида. *Вестник ВГМУ*. **2013**, 12(4), 63–69.
- (7) Мерзляк, Е. М. Исследование Долгосрочного Эффекта Высоких Доз Циклофосфамида на Репертуар Т-клеточных Рецепторов Т-лимфоцитов Периферической Крови у Пациентов с Аутоиммунными Васкулитами. *Вестник РГМУ*. **2017**, 5, 74–80.
- (8) Akhter, J., Yao, P., Johnson, L. A., Riordan, S. M., Morris, D. L. A New Peritoneal Carcinomatosis Model in Cyclosporine Immunosuppressed Rats. *Anticancer Res.* **2008**, 28 (1A), 105–109.
- (9) Ukpo, G. Evaluation of the Haematological and Biochemical Effects of Averno®, a Herbal Formulation, against Cyclophosphamide-Induced Immunomodulated Male Rats. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2013**, 4(9), 3556–3562.
- (10) Lee, H. Y.; Park, Y. M.; Kim, J.; Oh, H. G.; Kim, K. S.; Kang, H. J.; Kim, R. R.; Kim, M. J.; Kim, S. H.; Yang, H. J.; et al. *Orostachys Japonicus* A. Berger Extracts Induce Immunity-Enhancing Effects on Cyclophosphamide-Treated Immunosuppressed Rats. *Biomed Res. Int.* **2019**, 2019 (1), 1–9. <https://doi.org/10.1155/2019/9461960>.

- (11) Mohamed, W. A. Can Lactoferrin Modulate the Immunostimulant Activity of Levamisole in Rats Immunosuppressed by Cyclophosphamide? *J. Clin. Exp. Investig.* **2014**, 5 (1), 48-53. <https://doi.org/10.5799/ahinjs.01.2014.01.0358>.
- (12) Шухтин, В. В.; Гоженко, А. И.; Левицкий, А. П.; Шухтина, И. Н.; Влияние Квертулина на Биохимические Показатели Сыворотки Крови Крыс с Иммунодефицитом. *Дерматологія та венерологія.* **2013**, 3(61), 38-44.
- (13) Піняжко, О. Р. Експериментальне Відтворення Імунодефіциту у Щурів. *Актуальні проблеми сучасної медицини.* **2008**, 8(4), 123-127.
- (14) Цвіліховський, М. І.; Береза, В. І.; Січкач, В. С.; Голопура, С. І.; Грушанська, Н. Г.; Скиба, О. О.; Лазаренко, П. В.; Руденко, А. А.; Якимчук, О. М. *Внутрішні Незаразні Хвороби Тварин*; Аграрна освіта: Київ, 2014.
- (15) Амінов, Р. Ф.; Фролов, О. К.; Федотов, Є. Р. Спосіб визначення фагоцитарної активності нейтрофілів. 116579, 2018.
- (16) Золотарев, А. Г.; Пименов, Е. В.; Девришов, Д. А. Световая Микроскопия Микроорганизмов; Агровет: Москва, 2013.
- (17) Коржевский, Д. Э.; Гиляров, А. В. Основы гистологической техники. СпецЛит: СПб, 2010.
- (18) Суфияров, И. Ф.; Шафиков, Р. М.; Юлдашев, М. Т. Экспериментально-морфологическое Обоснование Применения Циклофосамида для Профилактики Послеоперационных Перитонеальных Спаек. *Пермский медицинский журнал*, **2008**, 15(3), 128-132.
- (19) Смирнов, О. Н.; Инчина, В. А.; Зорькина А. В. Экспериментальное Обоснование Миелопротекторного Действия Мексидола. *Российский онкологический журнал*, **2000**, 5, 25-27.
- (20) Нестерова, И. В.; Колесникова, Н. В.; Чудилова, Г. А.; Ломтатидзе, Л. В.; Ковалева, С. В.; Евглевский, А. А. Нейтрофильные Гранулоциты: Новый Взгляд на «Старих Игроков». *Иммунология*, **2015**, 4, 257-265
- (21) Хаитов, Р. М.; Пашенков, М. В.; Пинегин, Б. В. Роль Паттернраспознающих Рецепторов во Врожденном и Адаптивном Иммунитете. *Иммунология*, **2009**, 1, 66-76.
- (22) Кащенко, С. А.; Ерохина, В. В. Ультрамикроскопические Изменения Паразитовидных Желез Крыс После Коррекции Циклофосфан-индуцированной Иммуносупрессии Иммунофаном. *Український морфологічний альманах*, **2014**, 12(1), 61-64.